



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE
REHABILITACIÓN
Luis Guillermo Ibarra Ibarra

**ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DE PACIENTES
MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO DE EXOSTOSIS MÚLTIPLE**

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A:

DRA. LUCERO MARÍA JOSE MONTERDE CRUZ

PROFESOR TITULAR:

DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES

ASESOR:

DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO



MEXICO, D.F

DICIEMBRE 2015



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. ENRIQUEZ SANDOVAL

DIRECTORA DE EDUCACION EN SALUD

DRA XOCHIQUETZAL HERNÁNDEZ LÓPEZ

SUBDIRECTORA DE EDUCACIÓN MÉDICA

DR. ALBERTO UGALDE REYES RETANA

JEFE DE SERVICIO DE EDUCACIÓN MÉDICA

DRA MARGARITA VALDÉS FLORES

PROFESOR TITULAR

ASESOR CLÍNICO Y METODOLÓGICO

DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO

ASESOR CLÍNICO Y METODOLÓGICO

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mi asesor, el Dr. Alberto Hidalgo Bravo, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma.

Especial reconocimiento merece el Dr. Antonio Miranda Duarte y la Dra. María de la Luz Arenas Sordo por sus enseñanzas, paciencia durante estos tres años, y sobre todo por el apoyo que me brindaron durante los momentos más difíciles. También a la Dra. Margarita Valdés Flores por permitirme ser parte de este proyecto, y así mismo al Dr. Norberto Leyva García por permite ser parte de este instituto.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros del Departamento de Genética y, especialmente a mis compañeros médicos residentes por su amistad, comprensión y paciencia.

Un agradecimiento muy especial merece mi familia; Lucero, Alfredo y Cristóbal, por su amor, apoyo incondicional, comprensión, paciencia y el ánimo recibido especialmente durante esta época de mi vida.

De mismo modo agradezco profundamente, el apoyo económico mediante la beca impulso a la investigación, otorgada por la Fundación Carlos Slim para la realización de este proyecto.

A todos ellos, muchas gracias.

México, D.F. a 28 de mayo del 2015.

Carta compromiso Becarios Impulso

Beca Carlos Slim para el impulso a la Investigación en Salud, convocatoria 2015

Nombre del becario	LUCERO MARIA JOSE MONTERDE CRUZ
Nombre de la Institución Anfitriona	INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION
Nombre del Tutor	MARGARITA VALDES FLORES
Proyecto a realizar	SECUENCIACION DE LOS GENES EXT1 Y EXT 2 EN PACIENTES MEXICANOS CON DIAGNOSTICO DE EXOSTOSIS MULTIPLE

Por este conducto acepto las condiciones establecidas bajo el esquema Beca Carlos Slim para el impulso a la Investigación en Salud, convocatoria 2015 que a continuación se detalla.

La beca se otorga tras convocatoria pública en apoyo a la investigación del trabajo "SECUENCIACION DE LOS GENES EXT1 Y EXT 2 EN PACIENTES MEXICANOS CON DIAGNOSTICO DE EXOSTOSIS MULTIPLE" por un periodo de doce meses, comenzando el mes de mayo del presente año al mes abril del 2016.

El monto de la beca es de \$3,000 pesos mensuales, los cuales se depositarán en una cuenta bancaria que he proporcionado, durante un máximo de 12 meses.

Se entregará un reporte final del trabajo de investigación de conformidad con los requisitos que establezca el FCS, del 15 al 20 de marzo de 2016. De no cumplir con este requisito asumo que no recibiré el último pago correspondiente al mes de abril 2016.

Aunado a lo anterior, doy mi autorización a Fundación Carlos Slim para la difusión de los resultados del proyecto de investigación que llevaré a cabo, para los fines que a la institución más le convengan.

Atentamente,

LUCERO MARIA JOSE MONTERDE CRUZ

Índice

Resumen.....	6
Antecedentes históricos.....	8
Introducción.....	9
Bases moleculares.....	14
Relación genotipo-fenotipo.....	24
Diagnóstico.....	29
Tratamiento.....	29
Diagnóstico diferenciales.....	32
Asesoramiento genético.....	33
Objetivos.....	35
Planteamiento de problema y justificación.....	35
Hipótesis.....	36
Diseño del estudio.....	36
Tamaño de la muestra.....	36
Población del estudio.....	37
Metodología.....	38
Resultados.....	47
Discusión.....	59
Bibliografía.....	64

ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR DE PACIENTES MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO DE EXOSTOSIS MÚLTIPLE

Monterde Cruz Lucero María Jose. Médico Residente de tercer año de la especialidad en Genética Médica del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Hidalgo Bravo Alberto. Médico investigador en ciencias médicas del servicio de Genética Médica del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Valdés Flores Margarita. Profesora titular de la especialidad de Genética Médica e investigadora en ciencias médicas del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Resumen

La exostosis múltiple es una enfermedad hereditaria con un patrón de herencia autosómico dominante, con una penetrancia casi del 100%. Esta causada por mutaciones en el gen *EXT1* (MIM # 608177), en el 56-78% de los casos, y en el gen *EXT2* (MIM # 608210) en el 21-44%. Estos genes están localizados en los loci 8q24.11-q24.13 y en 11p11-p12, respectivamente. En el 70-95% de los casos de exostosis múltiple se detectan mutaciones en alguno de estos dos genes, y aproximadamente del 5 al 30% de los pacientes no se logran detectar mutaciones en los genes anteriormente mencionados, por lo que se propone la existencia de un tercer gen responsable llamado *EXT3*. Clínicamente la exostosis múltiple se caracteriza por presentar dos o más osteocondromas, principalmente en la región yuxta-epifisiaria de los huesos largos, aunque puede verse afectados otros huesos. La aparición y crecimiento de los osteocondromas ocurre principalmente en la primera década de la vida y hasta que el disco de crecimiento se cierra, terminando con la maduración esquelética durante la pubertad. Generalmente los osteocondromas son asintomáticos, aunque en ocasiones, pueden producir complicaciones secundarias a la compresión de componentes neurovasculares y/o

tendones, así como deformaciones esqueléticas. Los osteocondromas durante la adolescencia y la adultez tienen un riesgo de malignización del 0.5-5%, siendo el condrosarcoma periférico el tumor maligno más frecuente. En este trabajo se realizó un análisis clínico y molecular de una serie de pacientes mexicanos con diagnóstico de exostosis múltiple. El análisis molecular del gen *EXT1* reveló algunas variaciones en la secuencia previamente descritas en individuos afectados. Además se encontraron otras variantes que no han sido observadas previamente, estas últimas requieren ser estudiadas para identificar si son causantes de la enfermedad.

Antecedentes históricos

La primera descripción de exostosis múltiple se atribuye a Hunter en 1786 en su obra *Lectures on the Principles of Surgery* (Stieber & Dormans, 2005). Posteriormente, Boyer en 1814, fue el primero en describir a varios miembros de una familia con ésta patología. Virchow en 1858, nombró a la enfermedad como exostosis múltiple y posteriormente Keith sugirió el término de aclasia diafisaria; el cual fue muy utilizado en el Reino Unido (Hennekam, 1991). En 1925, Stocks y Barrington, recolectaron 1124 casos reportados en la literatura médica; 727 de estos procedían de 163 familias, de esta forma ellos concluyeron que 2/3 de los pacientes con exostosis múltiple tenían un familiar afectado, usualmente era uno de sus padres. Harris en 1948, analizó nuevamente los datos obtenidos de Stocks y Barrington, y determinó que ésta enfermedad tenía un patrón de herencia autosómico dominante. En 1960, Lorincz reportó que los pacientes con ésta patología tenían un incremento en la excreción urinaria de mucopolisacáridos ácidos de manera constante, principalmente de sulfato de condroitina. Él sugirió que este hallazgo podría explicarse por el aumento de volumen del cartílago; que es la principal fuente de mucopolisacáridos en niños con exostosis múltiple, a comparación de los valores normales en pacientes adultos, en los cuales las lesiones contenían poco cartílago (Solomon, 1964). El gen *EXT1* fue aislado en un paciente con múltiples osteocondromas que presentó una inv(8)(p23q24.1), es decir, una inversión pericéntrica del cromosoma 8 con un punto de ruptura en 8q24.1. A su vez, *EXT2* fue localizado mediante un análisis de ligamiento, a 3 centiMorgan (cM) de los marcadores *D11S1361* y *D11S554* (Ahn et al., 1995; Stickens et al., 1996). La función de las proteínas EXT no se conoció hasta 1998, cuando McCormick et al, estudiaron líneas celulares deficientes de sulfato de heparán en fibroblastos de ratón, revelando que *EXT1* y *EXT2* están implicados en la biosíntesis de sulfato de heparán y son los causantes de la exostosis múltiple (McCormick, Duncan, Goutsos, & Tufaro, 1999).

Introducción

El Osteocondroma o exostosis osteocartilaginosa es el tumor benigno más frecuente que afecta el tejido óseo. Se caracteriza por presentar una osificación endocondral, además de que la capa externa del osteocondroma es continua con el periostio del hueso subyacente. Los osteocondromas tienen distintas formas (sésiles o pediculados), y pueden aparecer de una forma aislada con una prevalencia de 1-2% en la población general (Trebicz-Geffen et al., 2008) o presentarse en una forma sindrómica al haber múltiples lesiones; esta última forma comprende un 15% de todos los casos de osteocondromas; denominándose entonces como osteocondromatosis múltiple (Liesbeth Hameetman, Bovée, Taminiou, Kroon, & Hogendoorn, 2004).

La enfermedad de exostosis múltiple (Online Mendelian Inheritance in Man; OMIM #133700), también conocida como osteocondromatosis múltiple o aclasia diafisaria (Bovée, 2008; Kevin B. Jones, 2012), es una enfermedad genética con un patrón de herencia autosómico dominante, con una penetrancia del 95%. Aproximadamente el 90% de los casos son familiares y el 10% se trata de casos *de novo* (Liesbeth Hameetman et al., 2004; Sarrion et al., 2011). Se calcula que esta enfermedad tiene una prevalencia de 1/50,000 en la población general en países Europeos, con una relación hombre:mujer de 1.5:1, y se cree que los hombres están más afectados debido a que el cierre del disco de crecimiento es más tardío que en las mujeres, lo que provoca mayor formación de exostosis. La prevalencia varía dependiendo de la población, por ejemplo en Guam, es una isla en el Pacífico occidental perteneciente a E.U.A, y en la comunidad de Pauingassi de Canadá, es de 1/1,000 y 1/77 respectivamente (Black, B., Dooley, J., Pyper, A., Reed, 1993; Ciavarella et al., 2013; Krooth, Macklin, & Hilbish, 1961).

La exostosis múltiple se caracteriza por presentar dos o más osteocondromas, las zonas más afectadas son la región yuxta-epifisiaria de los huesos largos, es decir en la región distal del fémur (90%), la región proximal de tibia (84%), peroné (76%) y húmero (72%). Sin embargo, también pueden afectar huesos planos tales como la mandíbula, iliacos o las escapulas (Fig. 1). Además, se ha reportado afectación de las vértebras, y muy raramente los metacarpos, metatarsos y calcáneos (Huegel et al., 2013; Jennes et al., 2009; Pannier & Legeai-Mallet, 2008).

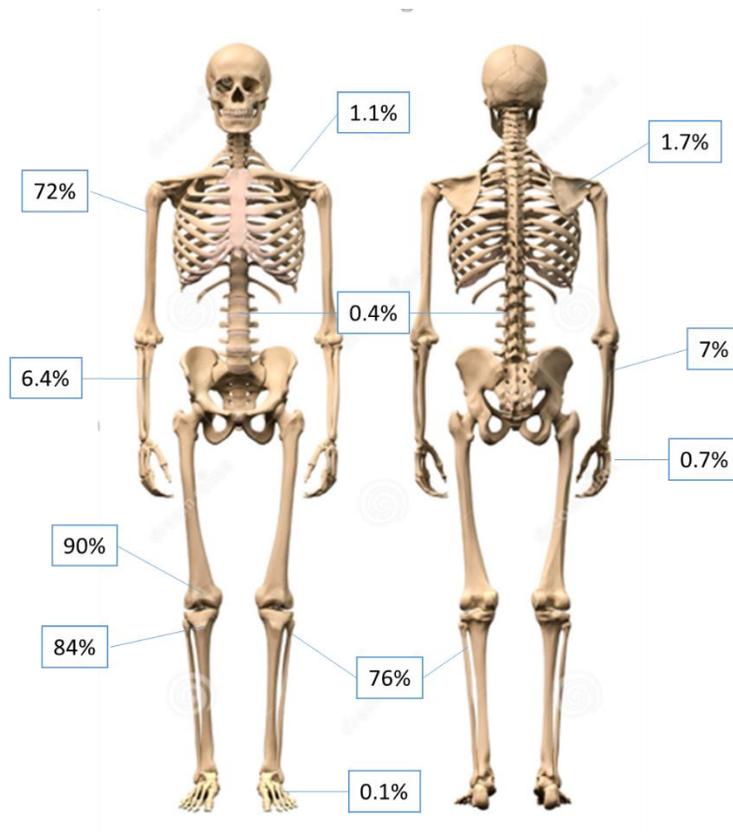


Figura 1. Esquema de la localización más frecuente de los osteocondromas en los pacientes con exostosis múltiple.

La aparición y crecimiento de los osteocondromas ocurre principalmente en la primera década de la vida y hasta que el disco de crecimiento se cierra, terminando con la maduración esquelética durante la pubertad. La aparición y crecimiento de los osteocondromas es a partir de los 2-3 años de edad hasta los 13-15 años, en promedio los pacientes presentan 6 osteocondromas variados en forma y tamaño (Fig 2). Generalmente los pacientes se refieren asintomáticos aunque en algunos casos, principalmente cuando los osteocondromas son pediculados, pueden producir complicaciones secundarias a la compresión de componentes neurovasculares (Pannier & Legeai-Mallet, 2008). La compresión nerviosa ocurre aproximadamente en un 22% de los casos; una de las estructuras más afectadas es el nervio peroneo superficial, principalmente durante la infancia, lo que puede ocasionar dorsiflexión del pie, y en algunas ocasiones pie en gota. Sin embargo, la complicación más grave es la compresión medular o de las raíces nerviosas, secundaria a la formación de exostosis en la superficie de las vértebras, esta complicación se manifiesta con alteraciones motoras o sensoriales, incluyendo trastornos de la marcha, debilidad o entumecimiento, hiperreflexia, espasticidad, e incontinencia. Otras complicaciones de las exostosis vertebrales son las alteraciones en la deglución cuando la tumoración está en contacto con el esófago. Las exostosis costales pueden interferir con la función pulmonar y causar un hemotórax, neumotórax espontáneo o derrame pericárdico, las cuales son condiciones que requieren intervención quirúrgica inmediata (Huegel et al., 2014).

Las alteraciones vasculares son más frecuentes en extremidades inferiores (83%), y comprenden un espectro variado desde compresiones vasculares hasta aneurismas o trombosis. Referente a las complicaciones esqueléticas, las deformidades son causa frecuente de morbilidad provocando acortamiento del cúbito secundario al encorvamiento del radio (39-60%) con subluxaciones secundarias de la cabeza del radio, pseudo-deformidad de Madelung secundaria al acortamiento del cúbito, crecimiento anormal de metacarpos y falanges proximales (30-70%); asimetría en la longitud de los miembros pélvicos (10-50%), genuvaro o

genuvalgo (8-33%) con dislocaciones secundarias de patelas, deformidad del tobillo (2-54%), talla baja desproporcionada (37-44%), coxa valga al haber una exostosis en el trocánter menor (25%), y artritis degenerativa de inicio temprano (Liesbeth Hameetman et al., 2004).



Figura 2. Ejemplo de lesiones observadas en pacientes con exostosis múltiple. Radiografía lateral de antebrazo derecho que muestra curvatura del radio (A) y deformidad de la muñeca (B). Radiografía AP y lateral de rodilla derecha (C y D) con una exostosis medial prominente. Además se observa valgo de la rodilla. Modificado de Andries, R; et al., 2013.

Durante la adolescencia y la adultez, los osteocondromas tienen un riesgo de malignización del 0.5-5%. El tumor maligno más frecuente es el condrosarcoma periférico (94%), seguido del osteosarcoma y sarcoma de células fusiformes (6%). El condrosarcoma periférico es un tumor de cartílago hialino y constituye aproximadamente el 15% de todos los condrosarcomas, y es el tercer tumor óseo maligno más frecuente después de mieloma y osteosarcoma (Liesbeth Hameetman et al., 2004). El riesgo de malignización es 2 veces mayor en hombres a

comparación de las mujeres. La edad promedio de aparición del condrosarcoma periférico secundario es de 34 años, afectando principalmente la pelvis y el fémur y menos frecuente la escapula y el húmero. Clínicamente se puede sospechar por la presencia de inflamación, dolor crónico y una tumoración palpable, con consecuentes alteraciones motoras.

Radiológicamente presentan una mineralización irregular e incrementada debido al aumento de más de 2 cm de la cubierta cartilaginosa del osteocondroma. Así mismo, se observan lóbulos de cartílago hialino que son separados por bandas de tejido fibroso, estos cambios se observan mejor en la resonancia magnética (RM) dinámica, mientras que los osteocondromas sólo muestran realce periférico (Kok et al., 2013; Stieber & Dormans, 2005). Para el diagnóstico se debe de realizar una biopsia que muestre hiper celularidad y células binucleadas, con múltiples células dispuestas en lagunas y con cambios mixoides (Fig. 3) (Andries, Jan, & Lieven, 2013). El pronóstico del condrosarcoma secundario es en general bueno, ya que es raro que haga metástasis, sin embargo el 10% de estos tumores son indiferenciados, muy agresivos y con gran capacidad de metástasis. La tasa de supervivencia a dos y a cinco años es del 38% y 24% respectivamente.

Además, es importante tener en cuenta que los cambios epigenéticos, como la hipermetilación de las islas CpG de los promotores de *EXT1*, producen el silenciamiento del gen, cuya función es de supresor de tumor, y se ha relacionado con otros tipos de cáncer, como de piel no melanoma y leucemias; especialmente la leucemia promielocítica y la leucemia linfoblástica aguda (Ropero et al., 2004). Así mismo, la pérdida de heterocigocidad de *EXT1* y del locus 8q se ha asociado con hepatocarcinoma y cáncer de pulmón, respectivamente. Además, se ha reportado que una alta expresión de *EXT1* en pacientes con mieloma múltiple, se asocia con un pobre pronóstico. Por otro lado, el cáncer de mama se ha relacionado con mutaciones en *EXT2* (Busse-Wicher, Wicher, & Kusche-Gullberg, 2014; Seitz

et al., 1997), y también se ha observado relación con cáncer de próstata (El Gammal et al., 2010) y cerebro.

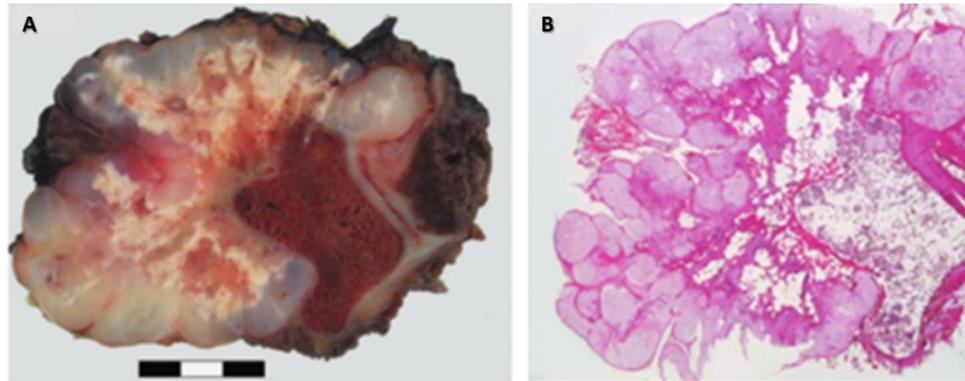


Figura 3. Condrosarcoma. (A) pieza patológica completa y (B) corte histológico de un condrosarcoma periférico secundario. El engrosamiento de la capa del cartílago es > 2 cm, y forma lobular del condrosarcoma periférico. Modificado de Hameetman et al, 2004.

Bases moleculares

La exostosis múltiple tiene una penetrancia del 95%, es decir que sólo el 5% de los individuos que presentan mutaciones en *EXT1* o *EXT2* no desarrollan las características clínicas de esta patología. Tiene además una expresividad variable; esto se refiere a que existe variabilidad fenotípica inter e intrafamiliar, lo que condiciona que la enfermedad no se comporte igual en todos los afectados.

El origen genético de la enfermedad presenta un fenómeno que se le conoce como heterogeneidad de locus, es decir que existe más de un gen causante de la enfermedad. En pacientes con exostosis múltiple de otras poblaciones se han encontrado mutaciones en el gen *EXT1* (MIM # 608177), localizado en el locus 8q24.11-q24.13 en el 56-78% de los casos y en el gen *EXT2* (MIM # 608210), localizado en 11p11-p12 en el 21-44% de los casos. Es decir, que en el 70-95% de

los casos de exostosis múltiple se detectan mutaciones en los genes *EXT1* y *EXT2*. En el resto de los pacientes (5-30%) no se logran detectar mutaciones en los genes anteriormente mencionados, por lo que se propone la existencia de un tercer gen causante de la enfermedad llamado *EXT3* presuntamente localizado en 19p (Jennes et al., 2009).

El gen *EXT1* está compuesto por 11 exones, mide aproximadamente 350 kilobases (kb) de ADN genómico, su promotor tiene características de un gen de mantenimiento, y está localizado aproximadamente 917 pares de bases (pb) corriente arriba del codón de inicio. Dentro de la región promotora hay un polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP) identificado como rs34016643, que modifica la actividad del promotor. Se ha demostrado que el alelo C aumenta un 56% la actividad del promotor, a comparación del alelo silvestre G (Jennes I, 2012). El ARNm de *EXT1* se expresa de manera ubicua y tiene una secuencia codificante de 2238 pb, codifica para la proteína Exostosina 1, formada por 746 aminoácidos.

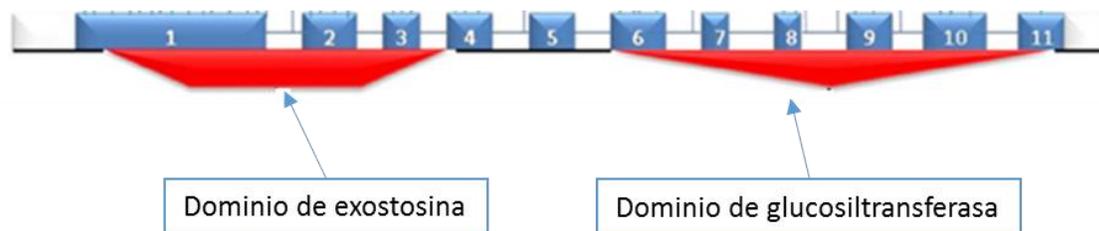


Figura 4. Esquema de la estructura de *EXT1*. Modificado de Ciavarella et al., 2013.

El gen *EXT2* tiene 16 exones y mide 108 kb de ADN genómico, su ARNm consiste en aproximadamente 3 kb, con un solo marco de lectura abierto de 2154 pb. En el extremo carboxilo terminal tiene una alta homología con *EXT1*. El ARNm de *EXT2* sufre procesos de corte y empalme alternativos en el exón 1a y 1b y sus

productos también son ubicuamente expresados, produce una proteína llamada Exostosina 2 de 718 aminoácidos. En la figura 4 y 5, se esquematiza el gen *EXT1* y *EXT2*, y los dominios de sus proteínas, respectivamente.

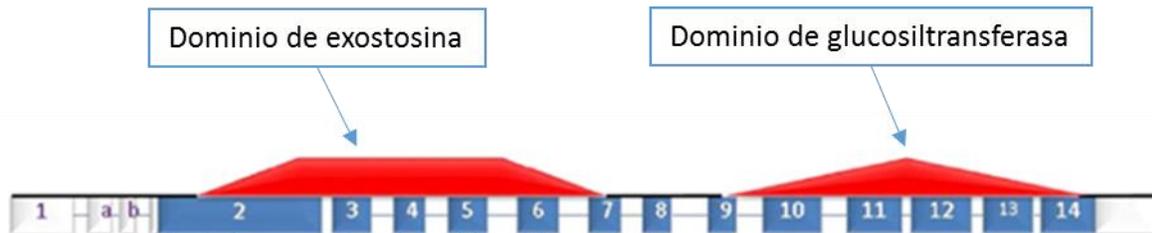


Figura 5. Estructura del gen *EXT2*. Modificado de Ciavarella et al., 2013.

Los productos de los genes *EXT1* y *EXT2* son glucoproteínas de membrana tipo II, de aproximadamente 80 KDa, y están localizadas en el retículo endoplásmico. Ambas proteínas forman un complejo hetero-oligomérico y se postula que la que tiene actividad enzimática como N-acetilglucosamintransferasa II y glucoroniltransferasa es *EXT1*. En tanto que *EXT2* no ha demostrado tener una actividad enzimática por sí misma, y se propone que juegue un papel en el plegamiento y movilización de *EXT1* (Huegel et al., 2013). El complejo de las proteínas EXT está involucrado en la síntesis y presentación del sulfato de heparán (HS) a la superficie celular. Se expresan de forma ubicua en diferentes tejidos, sin embargo, tienen una expresión preferencial en los condrocitos de los discos de crecimiento y otros tejidos tales como glándula mamaria, placenta, colon, músculo, leucocitos y células mesenquimales fetales (L Hameetman et al., 2007).

El sulfato de heparán es un polisacárido lineal altamente sulfatado que tiene un esqueleto de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y un residuo de ácido glucurónico (GlcA). El proceso de biosíntesis de este polisacárido incluye la fase de inicio, elongación, y modificación. La síntesis inicia en el retículo endoplásmico mediante

la adición de una xilosa a un residuo de serina mediante una xilosiltransferasa (Fig 6). El complejo oligomérico formado por EXT1 y EXT2 en el aparato de Golgi, cataliza la elongación de las cadenas de HS mediante la adición de dos residuos de galactosa y uno de GlcA mediante su actividad de galactiltransferasa I y II y glucuronosiltransferasa I, respectivamente. La longitud de la cadena de HS es específica de cada célula. Durante el ensamblaje, la cadena recién sintetizada sufre diferentes modificaciones como la N-desacetilación/ N-sulfatación, epimerización y O-sulfatación (Cuellar & Reddi, 2013; Huegel et al., 2014; Matsumoto, Irie, Mackem, & Yamaguchi, 2010).

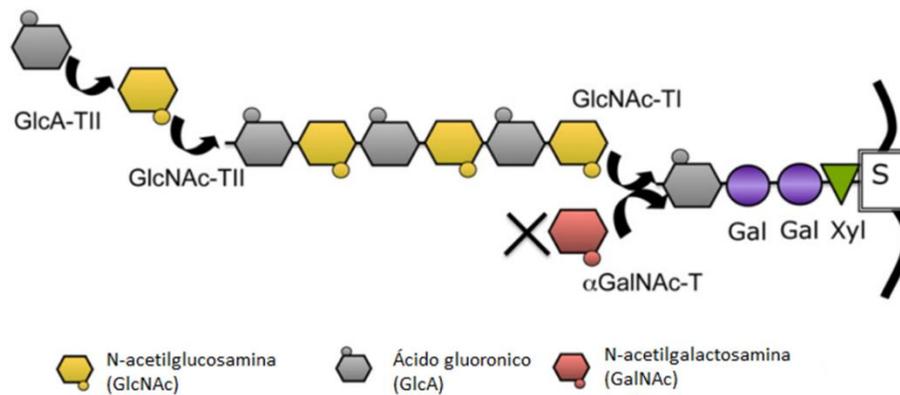


Figura 6 Esquema de síntesis del sulfato de heparan. Inicia con la unión de polisacárido-proteína, un tetrasacárido ($\text{GlcA}\beta 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{Xyl}$) es unido a un residuo de serina de las proteínas del núcleo. Después se adicionan $\alpha 1,4\text{-GlcNAc}$ mediante una $\text{GlcNAc-transferasa}$ (GlcNAc-T). El precursor de la cadena de HS (GlcA-GlcNAc)_n, se forma por la adición alterna de $\beta 1,4\text{-GlcA}$ y $\alpha 1,4\text{-GlcNAc}$ unida por la glucosiltransferasa (familia EXT) con GlcATII y/o GlcNAcTII . La adición de $\alpha 1,4\text{-GalNAc}$ al tetrasacárido por $\alpha\text{GalNAc-transferasa}$ termina la elongación de la cadena. Modificado de Busse-Wicher et al.,2014.

El HS es el componente principal (50%) de los glucosaminoglicanos de la membrana celular y de la matriz extracelular, el resto está conformado por sindecanos, dipicanos y perlecano. El HS tiene la capacidad para interactuar con diferentes proteínas de unión en las membranas plasmáticas de diferentes células, como receptores de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFR), quimiocinas y macromoléculas de la matriz extracelular (MEC), tales como la colágena, laminina y fibronectina. También participa en la adhesión celular y procesos de locomoción. De esta manera el HS regula la distribución y la capacidad de crecimiento, así como la señalización de proteínas y sus respectivas interacciones, funciones y la bioactividad en las células diana (Huegel et al., 2014). La heparanasa es la enzima endoglucosidasa responsable de la degradación de HS. Esta enzima juega un papel crucial en los procesos biológicos fundamentales asociados con la remodelación de la MEC, migración celular, angiogénesis y metástasis (Trebicz-Geffen et al., 2008). Dicha participación se debe a la relación del HS con factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFs), y el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β). Estas vías permiten la formación de condrocitos mediante la señalización de Hedgehog (Hh) o las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs).

Normalmente los productos de *EXT1* y *EXT2* funcionan como un complejo enzimático estable, por lo tanto, para la síntesis de HS funcional se requiere la presencia de ambas proteínas. Se propone que las mutaciones de los genes *EXT1* o *EXT2* producen un mecanismo de pérdida de función que conlleva a la síntesis de Exostosina trunca, resultando en la formación de un complejo EXT1/EXT2 defectuoso que altera la síntesis y elongación de HS, promoviendo su acumulación en el citoplasma y el desarrollo de osteocondromas (Fig. 7).(Cuellar & Reddi, 2013). Así mismo pertenecen al grupo de genes supresores de tumores, y la pérdida de heterocigocidad de los alelos mediante dos eventos mutacionales, de acuerdo a la hipótesis de Knudson, es necesario para el desarrollo de condrosarcoma en pacientes con exostosis múltiple (Cheung et al., 2001). En los casos familiares, el

primer evento es heredado por uno de los progenitores y el segundo ocurre en el tejido afectado. Se ha observado que los pacientes con mutaciones en *EXT1* tienen un riesgo ligeramente mayor de transformación maligna en comparación con los que portan mutaciones de *EXT2* (Liesbeth Hameetman et al., 2004).

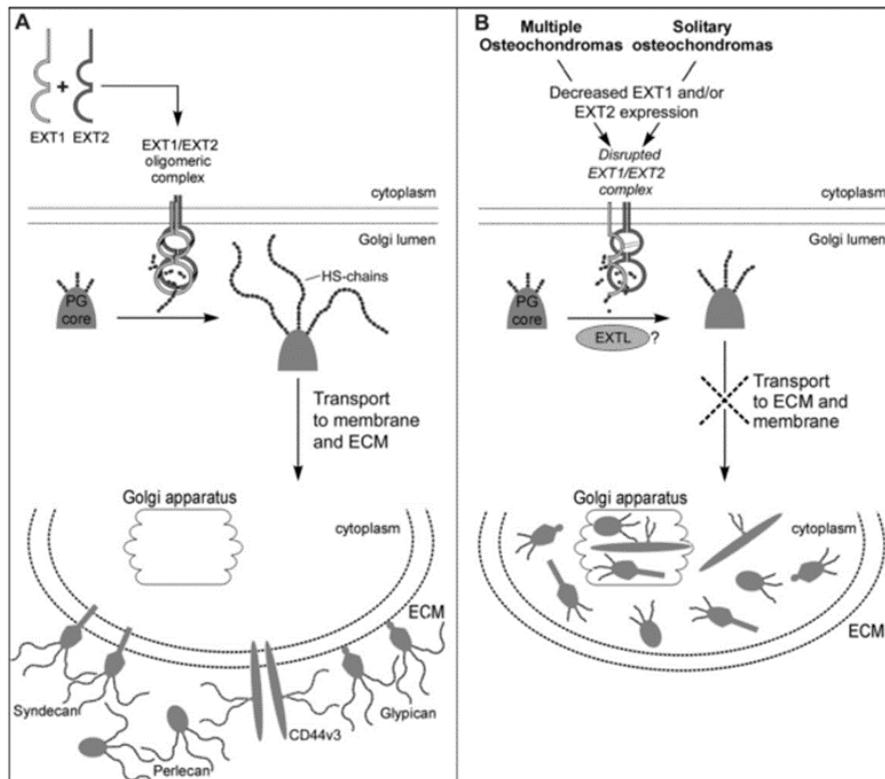


Figura 7. Representación esquemática de la función del complejo EXT1/EXT2 en la síntesis de sulfato de heparán (HS). (A) Normalmente EXT1 y EXT2 forman un complejo hetero-oligomérico involucrado en la síntesis de HS en el aparato de Golgi. EXT1/EXT2 polimerizan la cadena de disacáridos en los proteoglicanos, formando proteoglicanos de HS (HSPGs), estos posteriormente son transportados a la membrana celular o matriz extracelular (MEC). (B) En el osteocondroma y condrosarcoma, la expresión de *EXT1* y/o *EXT2* está disminuida, promoviendo la formación de un complejo EXT1/EXT2 disfuncional, incapaz de llevar a cabo la polimerización de los disacáridos de HS, permitiendo el acúmulo intracitoplasmático de HSPGs anormales. Modificado de L. Hameetman et al, 2007.

Actualmente se han reportado 713 variantes en la secuencia de *EXT1* y 386 en *EXT2* a nivel mundial, las cuales están registradas en la base de datos de exostosis múltiple llamada MOdb (*EXT1 homepage - Multiple Osteochondroma Mutation Database - Leiden Open Variation Database*). De los registros, 655 son variantes únicas, de estas 432 en *EXT1* y 223 en *EXT2*. En la base de datos de mutaciones humanas (*HGMD® home page*) se reportan 388 mutaciones en *EXT1* y 181 en *EXT2* asociadas a exostosis múltiple. Estos datos se presentan en las tablas 1 y 2 respectivamente. El 80% de las mutaciones encontradas en los genes *EXT1* y *EXT2* comprenden mutaciones de sentido equivocado, deleciones e inserciones (indels) que ocasionan corrimiento del marco de lectura y mutaciones que afectan el sitio de corte y empalme (splicing), lo que conlleva a productos proteicos con una terminación prematura, causando una degradación anticipada de la proteína. El 10% de las mutaciones reportadas se debe a deleciones intragénicas, ya sea de uno o más exones de *EXT1* y *EXT2* (Delgado et al., 2014). Las mutaciones en *EXT1* ocurren a lo largo de todo el gen; siendo los exones 1, 2, y 6 los más frecuentemente afectados. Mientras que en el gen *EXT2*, se concentran en el extremo N terminal por lo que se cree que esta región tiene un función primordial. Lo que parece ser contradictorio, ya que el extremo C terminal está altamente conservado; lo que implica una función importante para esta parte de la proteína. La mayor parte de las mutaciones son privadas y existen muy pocas mutaciones recurrentes consideradas como sitios calientes (Tabla 3). (Liesbeth Hameetman et al., 2004; Jamsheer et al., 2014; Jennes et al., 2009)

Tabla 1. Variantes en *EXT1* y *EXT2* reportadas en MOdb (2015).

Tipos de mutación	<i>EXT1</i>	<i>EXT2</i>
Corrimiento de marco de lectura	286	96
Sin sentido	158	137
Sitio de splicing	77	53
Sentido equivocado	133	50
Deleciones (≥ 1 exón)	16	9
Pequeñas deleciones en el marco de lectura	10	2
Pequeñas inserciones en el marco de lectura	1	0
Translocaciones	2	0
Otras	13	13
Polimorfismos	14	21
Indels	3	5
Total	713	386

Tabla 2. Mutaciones en *EXT1* y *EXT2* reportadas en pacientes con exostosis múltiple en HGMD® (2015).

Tipos de mutación	<i>EXT1</i>	<i>EXT2</i>
Sin sentido	89	42
Sitio de splicing	39	24
Sentido equivocado	43	18
Pequeñas indels	8	4
Pequeñas deleciones	135	54
Pequeñas inserciones	47	23
Grandes deleciones (≥ 1 exón)	22	13
Rearreglos complejos	5	0
Regulatorias	0	3
Total	388	181

Tabla 3. Mutaciones más frecuentemente reportadas en *EXT1* y *EXT2* en pacientes con exostosis múltiple según Jenne et al, 2009

Gen	Mutaciones a nivel de ADN	Mutaciones a nivel de proteínas	Número de veces reportadas
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
EXT2	c.67C>T	p.Arg23X	13
	c.514C>T	p.Gln172X	11
	c.55C>T	p.Arg182X	11
	c.679G>A	p.Asp227Asn	10
	c.1080-2A>G	Sitio de splicing	7
	c.1173G>A	Sitio de splicing	7
	c.1173G>A	p.Trp394X	7

Estudios mutacionales en *Drosophila melanogaster* han demostrado que la eliminación de los genes *Ext* conduce a una disminución importante de la expresión de los genes de la vía Hh, BMP y Wingles (Wnt). Estas tres vías son las principales determinantes del desarrollo óseo embrionario. La vía de Hh juega un papel crucial en la diferenciación de los condrocitos durante la formación de hueso endocondral en la placa de crecimiento. Este proceso comienza con el cambio de las células mesenquimales a condrocitos, éstos últimos tienen una diferenciación a través de etapas prehipertróficas e hipertróficas, hasta que finalmente se someten a apoptosis. Los condrocitos prehipertróficos expresan el ligando Indian hedgehog (Ihh). Este Ihh es un factor regulador importante para la formación de hueso endocondral, que está controlado por señales paracrinas. La formación es controlada por una retroalimentación negativa entre Ihh y la proteína relacionada a la parathormona (PTHrP), esto crea un microambiente en el que los condrocitos

pueden proliferar, migrar y morir (Fig. 8). Este proceso de maduración está mediado por las BMPs y necesita un control estricto por *Ihh* para mantener un equilibrio entre el crecimiento longitudinal del cartílago y su consiguiente osificación. Cuando los condrocitos son completamente diferenciados e hipertróficos, la expresión de *Ihh* se detiene, permitiendo la diferenciación de nuevos condrocitos. Las bases moleculares que llevan al desarrollo de osteocondromas aún no están completamente dilucidadas, se propone que las mutaciones en los genes *EXT* causan cadenas anormales de HS, conduciendo a alteraciones en la señalización de *IHH* y su control por medio del PTHrP, esto provoca una difusión anormal y un exceso de *IHH* libre, que se traduce en una diferenciación terminal de condrocitos en la placa de crecimiento, así como la formación de hueso pericondral (Andries et al., 2013).

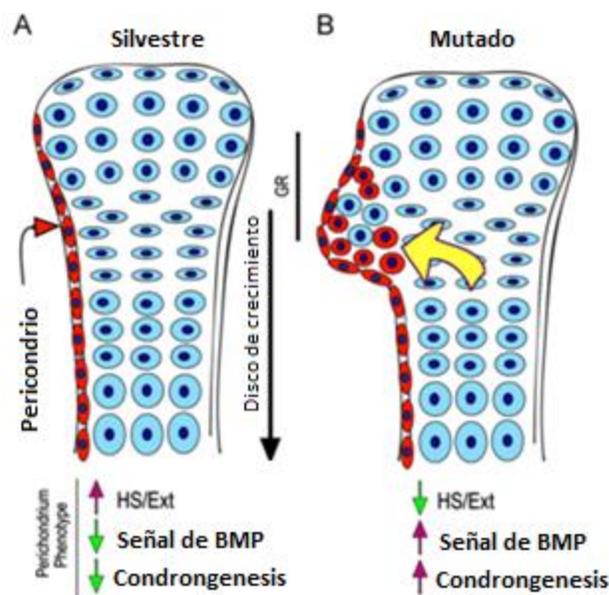


Figura 8. Modelo propuesto para la formación de exostosis. (A) El desarrollo de huesos largos con alelos silvestres de los genes *EXT*, los fenotipos de los pericondrocitos (rojo) y condrocitos (azul) se mantienen, permitiendo la morfogénesis y el crecimiento del esqueleto. (B) Al estar los genes *EXT* mutados, el pericondrio altera su estructura, debido a la disminución de HS, ocurren alteraciones en la vía de *IHH* con un aumento en la señalización de la BMP y de la condrogenesis produciendo la exostosis (células rojas redondas) Modificado de Huegel et al., 2013.

Relación genotipo - fenotipo

Hay muy pocos estudios acerca de la relación genotipo-fenotipo, algunos de ellos utilizan la escala propuesta por la Sociedad de Tumores Músculo-esqueléticos (Tabla 4), ésta escala evalúa las lesiones palpables, talla, deformidades y limitación funcional. En relación a las lesiones, se toma en cuenta la edad de inicio (antes o después de los 3 años), número de exostosis (>10 o <10 osteocondromas), localización de exostosis en vertebras (ausencia o presencia), talla (>p10 o <p10), deformidades y limitación funcional (bueno o aceptable). El grado de severidad se clasifica como moderado (M) o severo (S), éste último se subdivide en cuatro categorías de IS a IVS (Tabla 5 y 6) (Delgado et al., 2014; Francannet et al., 2001).

Tabla 4. Evaluación de la severidad del fenotipo.

	Edad de inicio (años)	No. De exostosis	Localización vertebral	Talla (percentil)	Valoración funcional
Severo	<3	>10	si	<10	Aceptable
Moderado	>3	<10	no	>10	Bueno

Tabla 5. Subgrupos del fenotipo severo.

	No. de exostosis	Localización vertebral	Talla (percentil)	Valoración funcional
Tipo IS	25	No	<10	Aceptable
Tipo IIS	25	No	<10	Aceptable
Tipo IIIS	10	Si	<10	Aceptable
Tipo IVS	10	No	<3	Aceptable

Tabla 6. Evaluación funcional.

Rango	Dolor	Braquimetacarpos	Deformidad		
			Acortamiento del antebrazo	Varo/valgo de rodillas (grados)	Acortamiento de extremidades
Bueno	Ausente/leve	-	Ausente/<1 cm	Ausente	Ausente/1 cm
Aceptable	Moderado/severo	+	>2 cm	>10	>2 cm

Francannet et al, estudiaron 42 familias francesas, con un total de 217 individuos afectados. Siete familias pertenecían al tipo M y 35 al tipo S, de estas últimas 10 tenían las características de tipo IS, cinco de tipo IIS, ocho de tipo IIIS, dos de tipo IVS y seis familias no podían asignarse a un tipo específico. Cuatro familias presentaron variabilidad intrafamiliar, entre un fenotipo leve en los abuelos a severo en los probandos. La mayoría de las familias con un fenotipo moderado (M) se asociaron a mutaciones en *EXT2*, mientras que todas las familias clasificadas como IIS, IIIS o IVS, excepto una, fueron asociadas a mutaciones en *EXT1* (Fig. 9) (Francannet et al., 2001).

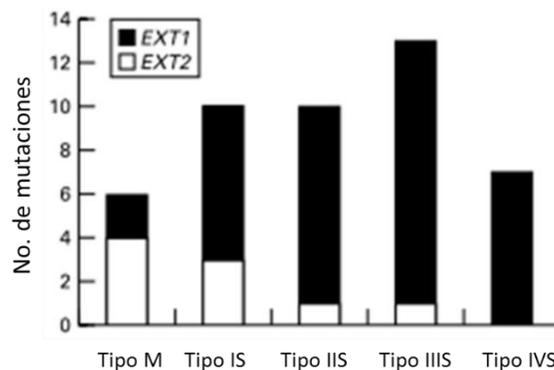


Figura 9. Relación genotipo-fenotipo. La distribución de las mutaciones en *EXT1* y *EXT2* en pacientes con exostosis múltiple clasificado como moderado (M) y severo (S). Modificado de Francannet et al.,2001.

Clement et al, estudiaron la severidad de la exostosis múltiple, en relación a la talla de los individuos afectados, ellos observaron que los pacientes con mutaciones en *EXT1* tienen una talla menor que los individuos con el gen *EXT2* mutado (Fig. 10) (Clement, Duckworth, Baker, & Porter, 2012)

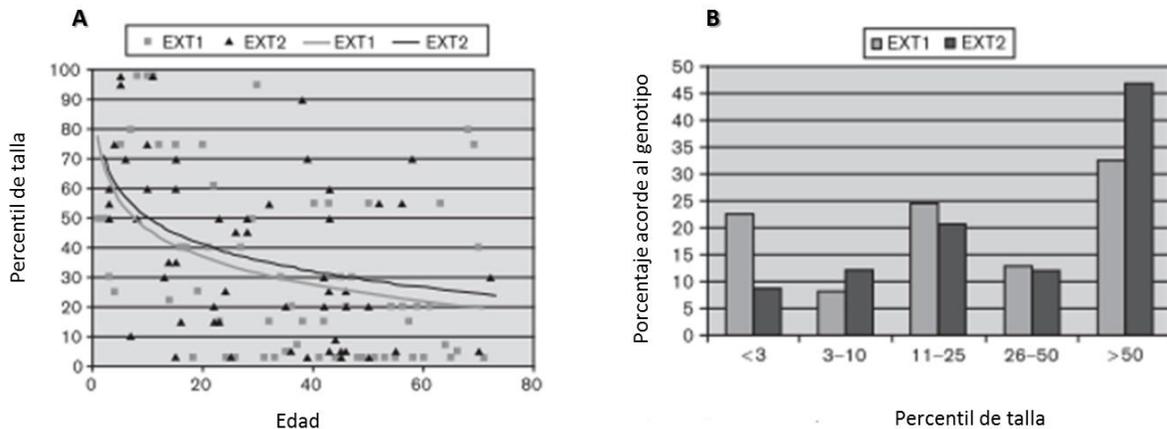


Figura 10. Relación genotipo-fenotipo en pacientes con exostosis múltiple. (A) Distribución de percentil de talla acorde a edad y mutaciones en *EXT1* y *EXT2*. (B) Percentil de estatura según su genotipo. Modificado de Clement et al., 2012.

A diferencia de los estudios anteriormente mencionados, Sarrion, et al, analizaron a 40 individuos españoles con exostosis múltiple no relacionados, y observaron que los individuos con fenotipo más severo presentaban mutaciones en *EXT2*, sin embargo, el número de mutaciones en este gen fue menor en comparación con las encontradas en *EXT1* (Sarrion et al., 2011).

Delgado et al, realizaron el primer estudio en pacientes latinoamericanos con osteocondromas, analizaron a 33 pacientes no relacionados, originarios de Chile y Argentina. En su grupo de estudio se incluyeron 18 hombres y 15 mujeres, de los cuáles 27 presentaron exostosis múltiple y 6 osteocondromas asilados. 21 pacientes con exostosis múltiple presentaron mutaciones en *EXT1* y *EXT2* (Fig. 11 y tabla 7) (Delgado et al., 2014).

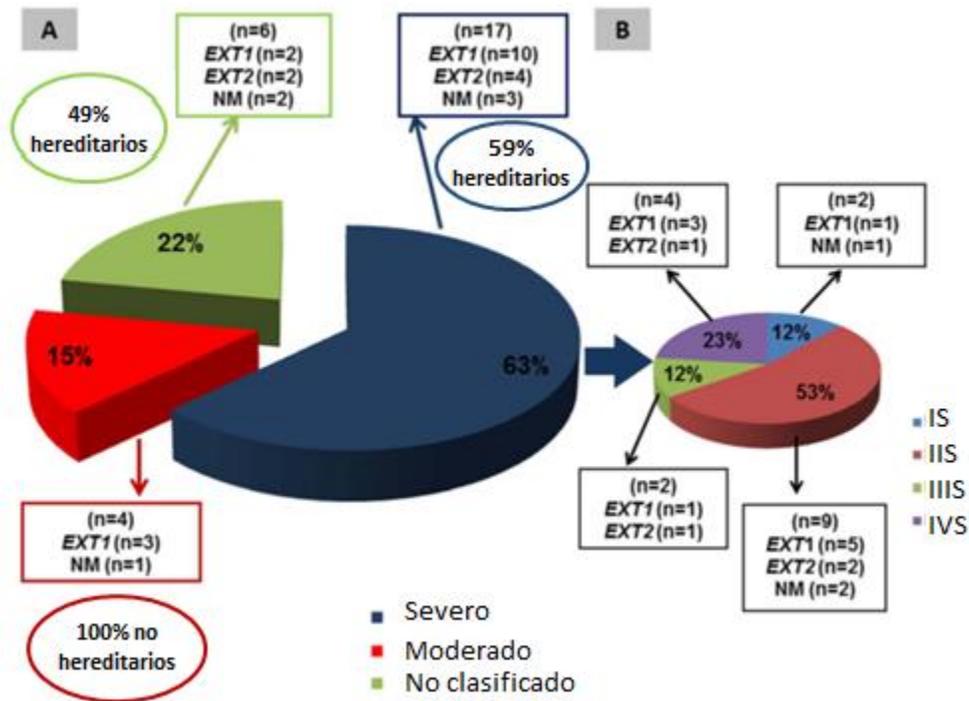


Figura 11. Relación genotipo-fenotipo en pacientes latinoamericanos con exostosis múltiple. (A) Muestra la proporción del fenotipo severo (azul), moderado (rojo) y pacientes no clasificados (verde) y su distribución de las mutaciones en *EXT1* y *EXT2*. (B) Subcategorías del fenotipo severo y su relación con el genotipo. NM = Sin mutación detectada. Modificado de Delgado et al., 2014.

Tabla 7. Relación genotipo-fenotipo en pacientes latinoamericanos con exostosis múltiple.
Modificado de Delgado et al.2014

Gen	Fenotipo	Exón-Intrón	Mutación	Cambio en proteína	Tipo de mutación
<i>EXT1</i>	IIS	Ex 1	c.248_249insA	p.Gln84Alafs*105	Corrimiento del marco de lectura
<i>EXT1</i>	M	Ex 1	c.232dupG	p.Val78Glyfs*111	Corrimiento del marco de lectura
<i>EXT1</i>	IS	Ex 1	c.369_370delAG	p.Lys126Asnfs*62	Corrimiento del marco de lectura
<i>EXT1</i>	IVS	Ex 1	c.752delT	p.Leu251X	Sin sentido
<i>EXT1</i>	IIS	Ex 1	c.791T>C	p.Leu264Pro	Sentido equivocado
<i>EXT1</i>	IVS	Ex 1	c.848T>A	p.Leu283X	Sin sentido
<i>EXT1</i>	M	Ex 1	c.916A>T	p.Lys306X	Sin sentido
<i>EXT1</i>	NA	Ex 1	ex1del	Desconoce	Delección
<i>EXT1</i>	IIS	Ex 2	c.1018C>T	p.Arg340Cys	Sentido equivocado
<i>EXT1</i>	IIS	Ex 2	c.1037G>C	p.Arg346Thr	Sentido equivocado
<i>EXT1</i>	NA	In 3-4	c.1164 + 1G>A	-	Sitio de splicing
<i>EXT1</i>	IIS	Ex 4	c.1219C>T	p.Gln407X	Sin sentido
<i>EXT1</i>	IIS	Ex 6	c.1469delT	p.Leu490Argfs*9	Corrimiento del marco de lectura
<i>EXT1</i>	IVS	In 8-9	c. 1722 + 1G>A	-	Sitio de splicing
<i>EXT1</i>	IIIS	Ex 9	c.1748A>G	p.Gln583Arg	Sitio de splicing
<i>EXT2</i>	NA	In 3-4	c.626 + 1G>A	-	Sitio de splicing
<i>EXT2</i>	IIS	Ex 5	c.920_929del10insTG	p.Asp307Valfs*45	Corrimiento del marco de lectura
<i>EXT2</i>	IIS	Ex 6	ex6del	Desconoce	Delección
<i>EXT2</i>	IIIS	Ex 8	c.1182G>A	p.Trp394X	Sin sentido
<i>EXT2</i>	NA	Ex 10	c.1616_1623del8ins10	p.Asp539Glnfs*5	Corrimiento del marco de lectura
<i>EXT2</i>	IVS	Ex 4-14	ex4-14del	Desconocido	Delección

Delgado et al, mencionaron que es difícil establecer un relación genotipo – fenotipo en pacientes con exostosis múltiple, puesto que la mayoría de las mutaciones son privadas. Sin embargo los pacientes con mutaciones en *EXT1* presentaron mayor número de osteocondromas a comparación de los que tuvieron en *EXT2*.

Diagnóstico

El diagnóstico de exostosis múltiple se sospecha con base en los hallazgos clínicos y radiológicos; aproximadamente el 50% de todos los pacientes con exostosis múltiple presentaran un osteocondroma visible a los 5 años, y el 80% a los 10 años (Andries et al., 2013; Jones, Pacifici, & Hilton, 2014), lo cual facilita el diagnóstico durante la infancia (Fig. 12). Sin embargo, algunos pacientes pueden ser sometidos a procedimientos quirúrgicos innecesarios que conllevan al retraso del diagnóstico.

El análisis molecular de los genes *EXT1* y *EXT2* puede ser una prueba complementaria para confirmar el diagnóstico, lo que impactaría en la calidad de vida de los pacientes, así como en el manejo médico a partir del genotipo.

Tratamiento

Como se mencionó anteriormente, los osteocondromas corresponden casi el 50% de los tumores benignos óseos que son quirúrgicamente tratables (Francannet et al., 2001; Liesbeth Hameetman et al., 2004). En ausencia de síntomas, la exostosis no requiere tratamiento quirúrgico. Es importante una valoración anual, que incluya radiografías, principalmente a los niños y adultos con exostosis múltiple que tengan osteocondromas en el esqueleto axial, dependiendo del tamaño y del dolor secundario que produzcan, particularmente aquellos que involucran la pelvis, debido al riesgo de transformación maligna en condrosarcomas (Fig. 12).

Las indicaciones para la resección quirúrgica de estos tumores, son la presencia de dolor, alteraciones en el crecimiento, que produzcan una deformidad angular, disminución de los arcos de movimiento de la articulación afectada, artritis degenerativa, compresión de estructuras neurovasculares o alteraciones cosméticas. Los pacientes con exostosis múltiple en promedio requieren tres cirugías a lo largo de la vida, principalmente durante la infancia, y el 70% tienen una cirugía a la edad de 18 años. En niños la cirugía es más riesgosa, ya que puede causar un daño irreversible en la placa de crecimiento. Aunque no hay formación de nuevas exostosis después de la pubertad, cuando las exostosis están cerca de las placas de crecimiento pueden seguir creciendo y causar más dolor y complicaciones, lo que lleva a una tasa de cirugía del 67% en los adultos. Las principales complicaciones de la resección quirúrgica reportadas son dolor, discapacidad y problemas implícitos en la cirugía. (Alvarez, Tredwell, De Vera, & Hayden, 2006; Huegel et al., 2014).

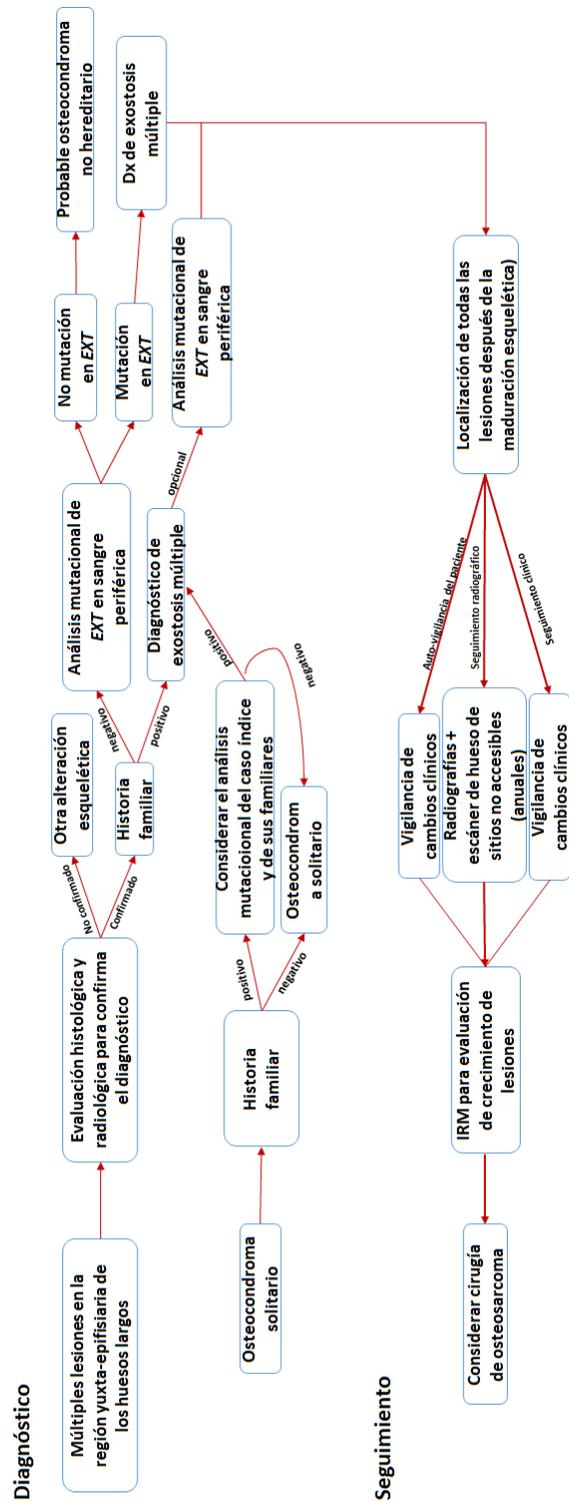


Figura 12. Diagrama de flujo sobre diagnóstico y seguimiento de pacientes con exostosis múltiple. Modificado de Hameetman et al.,2004.

Diagnóstico diferencial

Dentro de los principales diagnósticos diferenciales de exostosis múltiple se encuentran:

Displasia epifisiaria hemimélica (DEH, MIM #127800) también conocida como enfermedad de Trevor o aclasia tarso-epifisiaria. Es una alteración, no heredable, en el desarrollo con crecimiento excesivo del cartílago de una o más epífisis. Afecta predominantemente a las extremidades inferiores de forma unilateral, el crecimiento de estas lesiones terminan en la pubertad, generalmente se diagnostica antes de los 15 años de edad, es más frecuente en niños que en niñas (Kevin B. Jones, 2012).

Metacondromatosis (MC, MIM #156250) es un trastorno poco común, con herencia autosómico dominante, se caracteriza por presentar sincrónicamente osteocondromas múltiples y encondromas en niños. Los osteocondromas en la MC se localizan en manos y pies, principalmente en los dedos, y en la placa de crecimiento adyacente, generalmente no se asocian a talla baja secundaria a encorvamiento de los huesos largos o subluxaciones. Los osteocondromas frecuentemente se resuelven espontáneamente.

Síndrome de Langer Giedon o tricorriofalángico tipo II (MIM #190350) es un desorden genómico que involucra la delección de los genes *EXT1* y *TRPS1*. Los individuos afectados tienen dismorfias faciales (puente nasal ancho, punta nasal bulbosa, cabello escaso), déficit intelectual, exostosis y alteraciones digitales (epífisis cónicas).

Síndrome Potocki-Shaffer o síndrome de DEFECT 11 (MIM #601224) es un desorden genómico que involucra la delección de los genes *EXT1* y *ALX4*. Los afectados tienen exostosis múltiple, alteración en la osificación del cráneo (foramen parietal amplio), disostosis craneana y déficit intelectual (Pannier & Legeai-Mallet, 2008).

Asesoramiento genético

El síndrome de exostosis múltiple es una enfermedad hereditaria causada por mutaciones en los genes *EXT*. Tiene un modo de herencia autosómico dominante y una penetrancia del 95%, aunque en la mayoría de la literatura médica se considera como completa (Jamsheer et al., 2014; Jennes et al., 2009), el riesgo para los familiares es el siguiente:

Para los padres del probando:

- Aproximadamente el 90% de los casos de exostosis múltiple son familiares y el 10% son causados por una mutación *de novo* en los genes *EXT* (Kang et al., 2013).
- Se recomienda la evaluación clínica y radiográfica de los padres del probando con aparente mutación *de novo* a fin de descartar manifestaciones leves de la enfermedad.

Para los hermanos del probando:

- El riesgo para los hermanos del probando depende del fenotipo y/o genotipo de los padres; es decir si presentan la mutación en algunos de los genes *EXT*.

- Si los padres presentan la mutación en *EXT* o los datos clínicos suficientes para realizar el diagnóstico, el riesgo para cada hermano es del 50% de presentar la exostosis múltiple.
- Si ninguno de los padres de los individuos con exostosis múltiple, presenta datos clínicos sugestivos de esta entidad, el riesgo para los hermanos es bajo, sin embargo hay que tener en cuenta la posibilidad de la presencia del mosaicismo germinal

Para los hijos de los probandos:

- Tienen el 50% de riesgo por cada embarazo de heredar la mutación en *EXT* y presentar la enfermedad.

Objetivos:

Objetivo general:

- Investigar cuáles son las mutaciones más frecuentes en *EXT1* en pacientes mexicanos con exostosis múltiple a fin de implementar una prueba de apoyo diagnóstico.

Objetivos específicos:

- Estandarizar las condiciones para secuenciar *EXT1*.
- Secuenciar los exones de *EXT1* con el mayor número de mutaciones reportadas en pacientes con exostosis múltiple en otras poblaciones.
- Observar cuales son las mutaciones más frecuentes en *EXT1* en la población mexicana.
- Comparar los resultados del análisis mutacional con lo reportado para otras poblaciones.
- Contribuir al establecimiento de una correlación genotipo – fenotipo para exostosis múltiple.
- Aportar datos que ayuden a dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de la enfermedad.

Planteamiento de problema y justificación:

La exostosis múltiple está causada por mutaciones en los genes *EXT1* y *EXT2*. En la mayoría de las poblaciones estudiadas se han reportado un mayor número de mutaciones en *EXT1*, excepto en población china donde han sido en *EXT2*. En México el diagnóstico de la enfermedad se basa en criterios clínicos, sin embargo en ocasiones el diagnóstico se retrasa y los pacientes llegan a ser expuestos a procedimientos innecesarios. Por lo tanto, sería de gran utilidad contar

con una prueba que complemente el diagnóstico. La posibilidad de hacer un diagnóstico de certeza impactará en la calidad de vida de los pacientes y en la utilización de los recursos humanos y materiales en Salud.

Hipótesis:

Los genes *EXT1* y *EXT2* son los principales responsables de la exostosis múltiple; el gen *EXT1* es el que se encuentra principalmente mutado en la mayoría de las poblaciones previamente estudiadas, de acuerdo a los reportes en la literatura médica mundial. Se espera encontrar un comportamiento similar en la población mexicana, tanto en el número de casos detectados mediante la prueba molecular como en la distribución de las mutaciones en *EXT1* ya que el fenotipo no difiere con el descrito en otros países.

Diseño del estudio:

- Retrospectivo, transversal, descriptivo, observacional exploratorio.

Tamaño de la muestra:

La muestra se obtuvo a conveniencia, en total se reclutaron 38 pacientes. Se secuenciaron los exones con el mayor número de mutaciones reportadas del gen *EXT1* de individuos que hayan sido valorados por el servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación en un periodo comprendido 2009-2015, que cumplan con los criterios de inclusión y acepten participar en el estudio.

Análisis y métodos estadísticos:

Debido al tipo de estudio no se realizarán pruebas estadísticas. Sólo se presentará estadística descriptiva

Población del estudio:

Criterios de Inclusión:

- Individuos mestizo-mexicanos que sean pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación y que hayan sido valorados por el servicio de Genética.
- Individuos que tengan perfil radiológico donde se observen más de un osteocondroma.
- Individuos que tengan diagnóstico clínico de exostosis múltiple con o sin familiares de primer grado afectados.
- Individuos que otorguen su consentimiento informado para participar en este estudio.

Criterios de Exclusión:

- Individuos que tengan un osteocondroma aislado, sin antecedentes de familiares con exostosis múltiple.

Criterios de Eliminación:

- Individuos que se nieguen a participar en el estudio al no firmar el consentimiento informado o se rehúsen a la toma de una muestra de sangre periférica.

Metodología

- Toma de muestra sanguínea
- Se limpió previamente con una torunda alcoholada la zona a puncionar para desinfectar
- Con una jeringa estéril se les tomó una muestra de 5 ml de sangre
- La muestra de sangre se colocó en un con EDTA

Extracción de ADN (Gentra Puregene Blood Kit®) 3 ml de sangre

Para la extracción de ADN se utilizó el Gentra Puregen Blood Kit (Qiagen) utilizando el protocolo recomendado por el fabricante:

1. Se agregaron 900 μ l de la solución de lisis RBC en un tubo de 1.5 ml
2. Se agregaron 300 μ l de sangre total al tubo, y se mezcló invirtiendo 10 veces.
3. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Se invirtió el tubo al menos una vez durante la incubación.
4. Se centrifugó a 2000x g por 2 minutos para sedimentar los leucocitos.
5. Se desechó cuidadosamente el sobrenadante con la pipeta o decantándolo, dejando aproximadamente 10 μ l de líquido residual y el botón de leucocitos
6. Se agitó el tubo vigorosamente en el vórtex y se resuspendió el botón leucocitario en el líquido residual.
 - Se agitó para facilitar la lisis celular en la siguiente etapa.
7. Se agregaron 300 μ l de solución de lisis celular, y se pipeteó para lisar las células durante 10s.
 - Por lo general, no se requirió de incubación; sin embargo, si se observaban grumos celulares se incubaba a 37 °C hasta que la solución fuera homogénea.
8. Se agregaron 100 μ l de solución de precipitación de proteínas, y se agitó vigorosamente durante 20 segundos a alta velocidad.
9. Se centrifugó durante 5 min a 2,000 x g

- Los precipitados de proteínas formaban condensados de color marrón oscuro.
 - Si los precipitados de proteína no estaban condensados, era necesario incubar en hielo durante 5 min y repetir la centrifugación.
10. Se adicionaron 300 μ l de isopropanolol en un tubo limpio de 1.5 ml, y se agregó al sobrenadante de la etapa anterior cuidadosamente.
- Se aseguró que el sedimento de proteína no se desprendiera durante el vertido.
11. Se mezcló invirtiendo suavemente 50 veces hasta que el ADN fue visible como hilos.
12. Se centrifugó por 3 min a 2,000 x g
- El ADN fue visible como un pequeño sedimento blanco.
13. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante, y se drenó el tubo invirtiéndolo sobre una hoja limpia de papel absorbente, se tuvo cuidado de que el sedimento permaneciera en el tubo.
14. Se añadieron 300 μ l de etanol al 70% y se invirtió varias veces para lavar el sedimento de ADN.
15. Se centrifugó durante 1 min a 2,000 x g.
16. Se desechó cuidadosamente el sobrenadante, volteando el tubo en un pedazo de papel absorbente limpio, se tubo cuidado que el botón permaneciera en el tubo.
- Se dejó secar al aire el sedimento por 5-10 minutos.
 - Se evitó el exceso de secado del sedimento de ADN, pues se vuelve difícil de disolver.
17. Se añadieron 100 μ l de solución de hidratación de ADN y se vortexeó durante 5 segundos a velocidad media para mezclarlo.
18. Se incubó a 65°C por 1 h para que se disolviera el ADN.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los exones 1, 2, 6 y 9 de *EXT1* se realizó utilizando los oligonucleótidos previamente descritos por Chen et al (Chen, Chi, Chuang, & Jou, 2006) descritos en la tabla 8:

Tabla 8. Oligonucleotidos utilizados en el análisis de gen *EXT1* en este estudio.

<i>EXT1</i>	E1-1F	5'-atgcaggccaaaaaacgcta-3'
	E1-1R	5'-ctt cgcaccaac ttgatg-3'
	E1-2F	5'-gtgcag agtctccact tgtg-3'
	E1-2R	5'-agcct ggaactgagc aaatc-3'
	E2-F	5'-gaaaagtga gagctgcctg c-3'
	E2-R	5'-ggtg gagggaggat ttactc-3'
	E6-F	5'-gcagcttttc atctgtttc tgtcctgtc-3'
	E6-R	5'-attcttgga gtgaaatctg-3'
	E9-F	5'-cac agtccccgga ttttgca-3'
	E9-R	5'-gcttggga tcatcactg ag-3'

Cada reacción de PCR de 10 µl contenía lo siguiente (Tabla 9):

Tabla 9. Componentes de la reacción de PCR

	1x
Agua inyectable	4.3 µl
Buffer 10X	1 µl
MgCl ² 25 mM	0.6 µl
DNTPs 0.2mM	1 µl
Oligonucleótido R 10 µM	0.5 µl
Oligonucleótido F 10 µM	0.5 µl
ADN (50ng/ µl)	2 µl
Taq polimerasa 5u/ µl	0.1 µl
Total	10 µl

Se preparó la master mix en tubos de 500µl de acuerdo al número de muestras a analizar. Las muestras se colocaron en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) y se programó de la siguiente manera (Fig. 13):

- Etapa de desnaturalización inicial
 - Temperatura: 95°C
 - Tiempo: 5 minutos
-
- 38 ciclos con las siguientes condiciones:
 - Etapa de desnaturalización
 - Temperatura: 95°C
 - Tiempo: 30 segundos
 - Etapa de alineamiento
 - Temperatura: variable según los oligonucleótidos (56-62°C)
 - Tiempo: 15 segundos
 - Etapa de extensión
 - Temperatura: 72°C
 - Tiempo: 1 minuto
 - Y una fase final de extensión
 - Temperatura: 72°C
 - Tiempo: 7 minutos

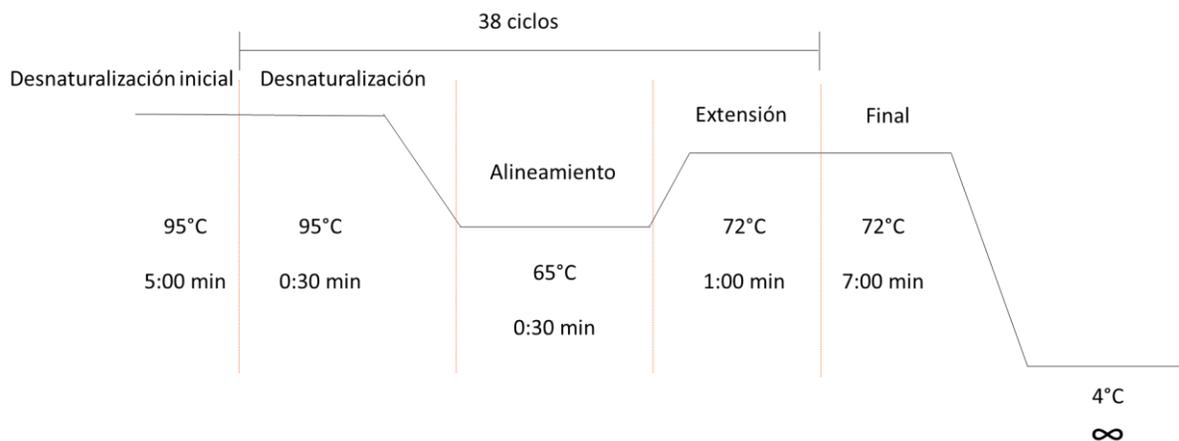


Figura 13. Fases de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Alineación de 56 a 62°C según el primer usado.

Las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos se describen a continuación (Tabla 10):

Tabla 10. Temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos empleados en nuestro estudio.

Primer	Temperatura de alineamiento
<i>EXT1 E1-1F</i>	56 °C
<i>EXT1 E1-1R</i>	56 °C
<i>EXT1 E1-2F</i>	56 °C
<i>EXT1 E1-2R</i>	56 °C
<i>EXT1 E2-F</i>	62 °C
<i>EXT1 E2-R</i>	62 °C
<i>EXT1 E6-F</i>	56 °C
<i>EXT1 E6-R</i>	56 °C
<i>EXT1 E9-F</i>	56 °C
<i>EXT1 E9-R</i>	56 °C

Electroforesis en gel de agarosa

Elaboración del gel de agarosa para la electroforesis

- Se tomó un matraz limpio y se agregaron 50 ml de buffer TAE (tris-acetato-EDTA).
- Se disolvió un gramo de agarosa para obtener una concentración del 2%.
- Se calentó durante un minuto en el horno microondas y se agitó ligeramente hasta que se disolviera la agarosa.
 - Se preparó la cámara de electroforesis, colocando un peine para formar 10 pozos.
- Se agregó la solución de agarosa al 2% y se dejó polimerizar. Una vez polimerizado el gel, se retiró con cuidado el peine.

Electroforesis

- Se llenó la cámara con suficiente buffer TAE para que se cubriera el gel.
- Se conectaron los cables (rojo/negro) de la fuente de poder a sus respectivos electrodos.
- Se colocaron 100 ng del marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen) y 2 μ l de cada uno de los productos de PCR de manera ordenada.
- Se realizó la electroforesis a 100 V por 30 minutos
- Una vez terminada, se retiró el gel de agarosa del buffer TAE
- Se colocó en una solución con bromuro de etidio por 5 minutos
- Se puso el gel en una cámara fotografía bajo luz UV y se capturó la imagen en programa de Kodak en un equipo de cómputo para verificar la amplificación del fragmento de interés.

Precipitación de los productos de PCR

- A cada reacción de 10 μ l, se le agregaron 10 μ l de agua bidestilada.
- Se añadieron 5 μ l de acetato de sodio al 3M.
- Se agregaron 13 μ l de isopropanolol absoluto, y se transfirió a un tubo de 1.5 ml.
- Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos, y posteriormente se decantó el sobrenadante.
- Se agregaron 120 ml de etanol al 75% al botón para lavarlo,
- Se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos, y posteriormente se decantó el sobrenadante cuidadosamente micropipeta.
- Se resuspendió el ADN en 10 μ l de agua destilada

Secuenciación

PCR de secuencia

- Para la reacción de secuencia se utilizó el kit de Big Dye Terminator v3.0 (Applied Biosystems)
- Cada reacción de secuencia de 10 µl estaba compuesta por (Tabla 11):

Tabla 11. Componentes de la reacción de secuencia

Agua destilada	4 µl
Buffer 5x BDterminator v.3	2 µl
Oligonucleótido 3.2 µM	1 µl
ADN (productos de PCR)	~10 ng
Big Dye terminator v.3	1 µl
Total	10 µl

Se realizó 25 ciclos de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) de secuencia. La fase de desnaturalización fue a una temperatura de 97°C por 30 segundos, la de alineamiento a 50°C por 15 segundos y la fase de extensión a 60°C por 4 minutos. Los productos de PCR se secuenciaron mediante un técnica tipo Sanger, en un equipo ABI Prism 3100 genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Centri-sep

Las columnas Centri-sep son usadas para una rápida y eficiente purificación de grandes moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos complejos) hasta moléculas pequeñas como nucleótidos, buffer, sales, etc. En nuestro caso fueron utilizadas para la purificación de los productos de la PCR de secuencia de los exones 1, 2, 6 y 9 del gen *EXT1*. El procedimiento constó de los siguientes pasos:

1. Hidratación de la columna
 - 1.1. Se golpeó suavemente la columna para que el gel seco se asentara.
 - 1.2. Se retiró la tapa superior y adicionó 0.80 ml de agua bidestilada para reconstituir la columna.
 - 1.2.1. Se tapó la columna y se hidrató el gel mediante inversión de la columna o colocándola en el vórtex por un breve instante. Dejando que solidificará el gel.
 - 1.3. Se dejaron hidratar las columnas a temperatura ambiente por 30 minutos antes de usarlas.
 - 1.3.1. Las Columnas reconstituidas se pueden almacenar refrigerándolas a 4°C durante varios días.

2. Remueva el líquido intersticial
 - 2.1. Se eliminaron las burbujas de aire de la columna de gel invirtiendo y golpeando ligeramente la columna.
 - 2.2. Después de que el gel haya solidificado y está libre de burbujas, se retiró la tapa de la columna superior, y luego la inferior.
 - 2.3. Se drenó el exceso del líquido de la columna (por gravedad) en un tubo de limpio de 2 ml.
 - 2.4. La columna se centrifugó a 750 × g durante 2 minutos para eliminar el líquido intersticial.

3. Procesamiento de la muestra
 - 3.1. Cada muestra se transfirió directamente sobre el centro de la cama de gel en la parte superior de la columna, sin perturbar la superficie del gel (Fig 14).
 - 3.2. La columna se colocó en un tubo colector limpio (1,5 ml) y se centrifugó a 750 × g durante 2 minutos. .
 - 3.3. Las muestras se desecaron por medio de vacío sin aplicar calor.

3.4. Una vez que las muestras están completamente secas se resuspendieron en 15 μ l de formamida y se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos para la secuenciación capilar.

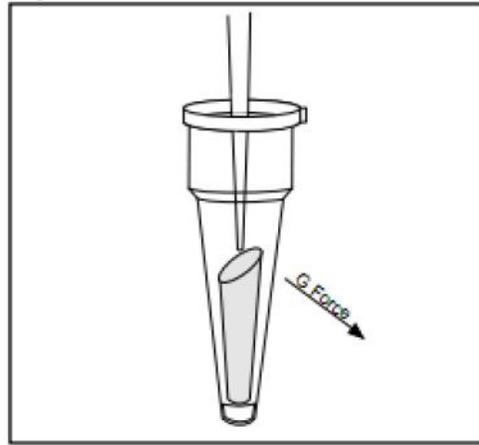


Figura 14 Colocación de la muestra en la columna para purificación de los productos de secuencia.

Resultados:

De abril de 2010 a abril de 2015, se reclutaron 38 pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación valorados por el servicio de Tumores óseos y Genética con diagnóstico clínico de exostosis múltiple (osteochondromatosis múltiple), se les tomó una muestra sanguínea para extracción de ADN y secuenciación de *EXT1*, previa autorización mediante el consentimiento informado.

De los 38 pacientes, fueron 20 hombres y 18 mujeres, con una relación hombres: mujeres de 1.1:1, el rango de edad 6 a 68 años. 12 casos fueron esporádicos y 25 casos familiares, y se desconocen antecedentes familiares de 1 paciente (Fig. 15). En la figura 16 se muestran el árbol genealógico de 3 familias afectadas con exostosis múltiple. El origen de los pacientes es variable, ya que por tratarse de un instituto de referencia nacional, la mayoría de los pacientes son provenientes del Distrito Federal y Estado de México (Fig. 17). La edad media de diagnóstico de nuestra cohorte fue de 9.1 años.

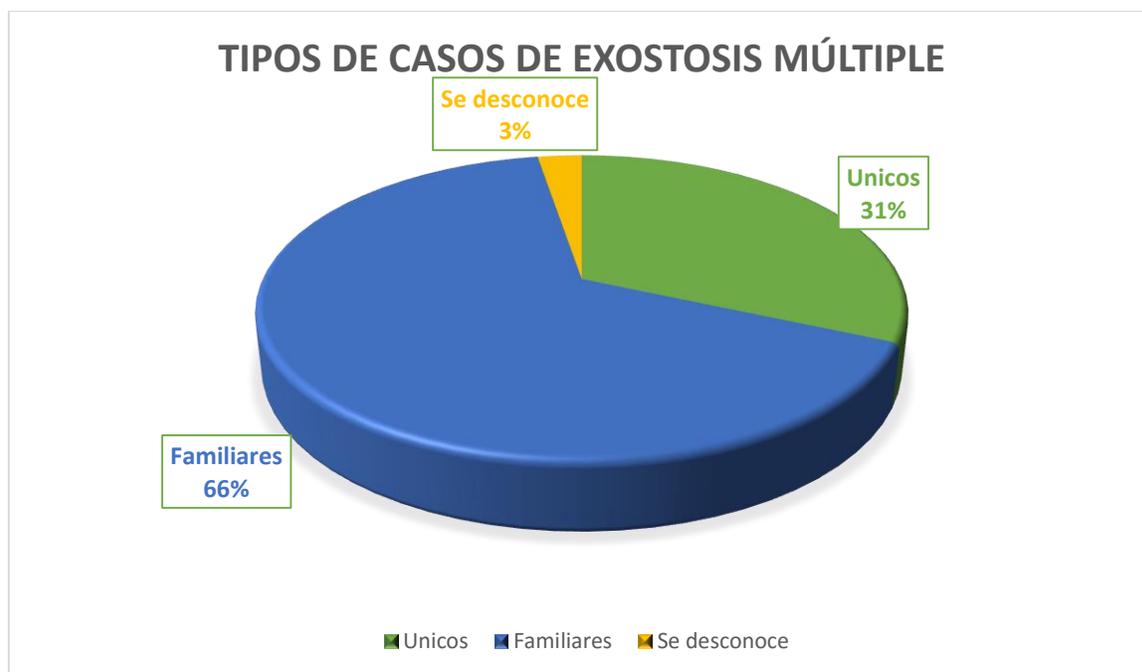


Figura 15. Gráfica que representa los tipos de casos osteocondromas de los de los pacientes con exostosis múltiple estudiados en el INR.

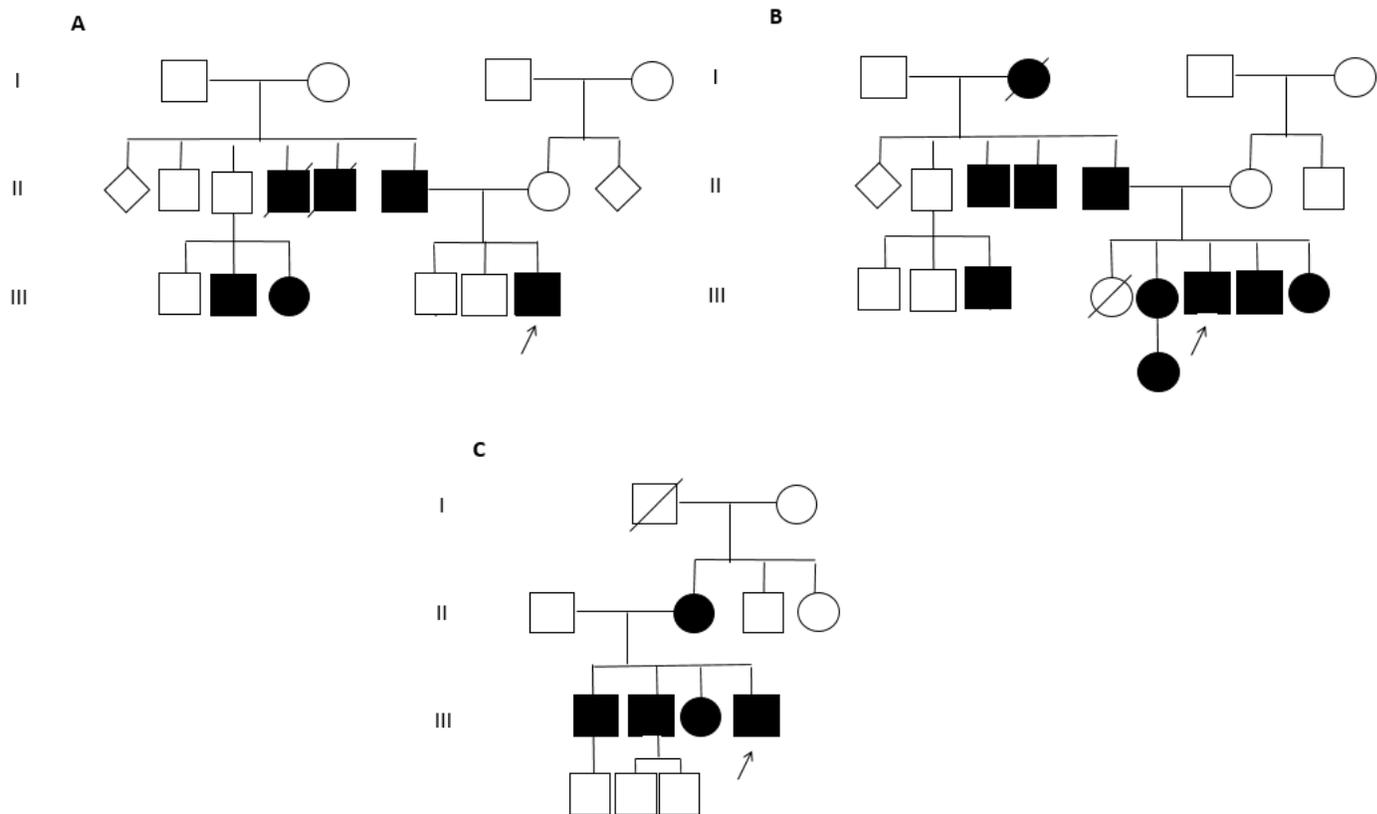


Figura 16. Casos familiares de exostosis múltiple estudiados en el INR. Árbol genealógico del paciente ARMA (A. Se desconoce cuál individuo de la generación I era el afectado). DHY (B), MBR (C).



Figura 17. Gráfica del lugar de origen de los de los pacientes con exostosis múltiple estudiados en el INR.

A 12 de los 38 pacientes se les había realizado la búsqueda de mutaciones en el gen *EXT1* previamente, por lo que se procedió a analizar el ADN de los pacientes restantes. No se analizaron 5 muestras debido a problemas con la concentración o calidad del ADN. Se realizó el análisis parcial de la secuencia del gen *EXT1* a 21 pacientes mexicanos con datos clínicos de exostosis múltiple valorados en el Instituto Nacional de Rehabilitación. En el grupo de estudio 10 fueron mujeres y 11 hombres. Se encontraron 10 casos familiares y 11 casos esporádicos. En promedio, se observaron 8 osteocondromas por individuo, y la localización más frecuente fue radio y cúbito (81%), en la articulación de la rodilla (71%), fémur (62%), región costal (62%), húmero (57%), tibia y peroné (52%), tobillo (48%), huesos de la mano (33%, incluyendo falanges y metacarpos), escapula, clavícula y pelvis (19% cada una), pie (10%) (Fig 18). La edad de detección de los osteocondromas fue 8.5 años con una rango de 2 a 17 años.

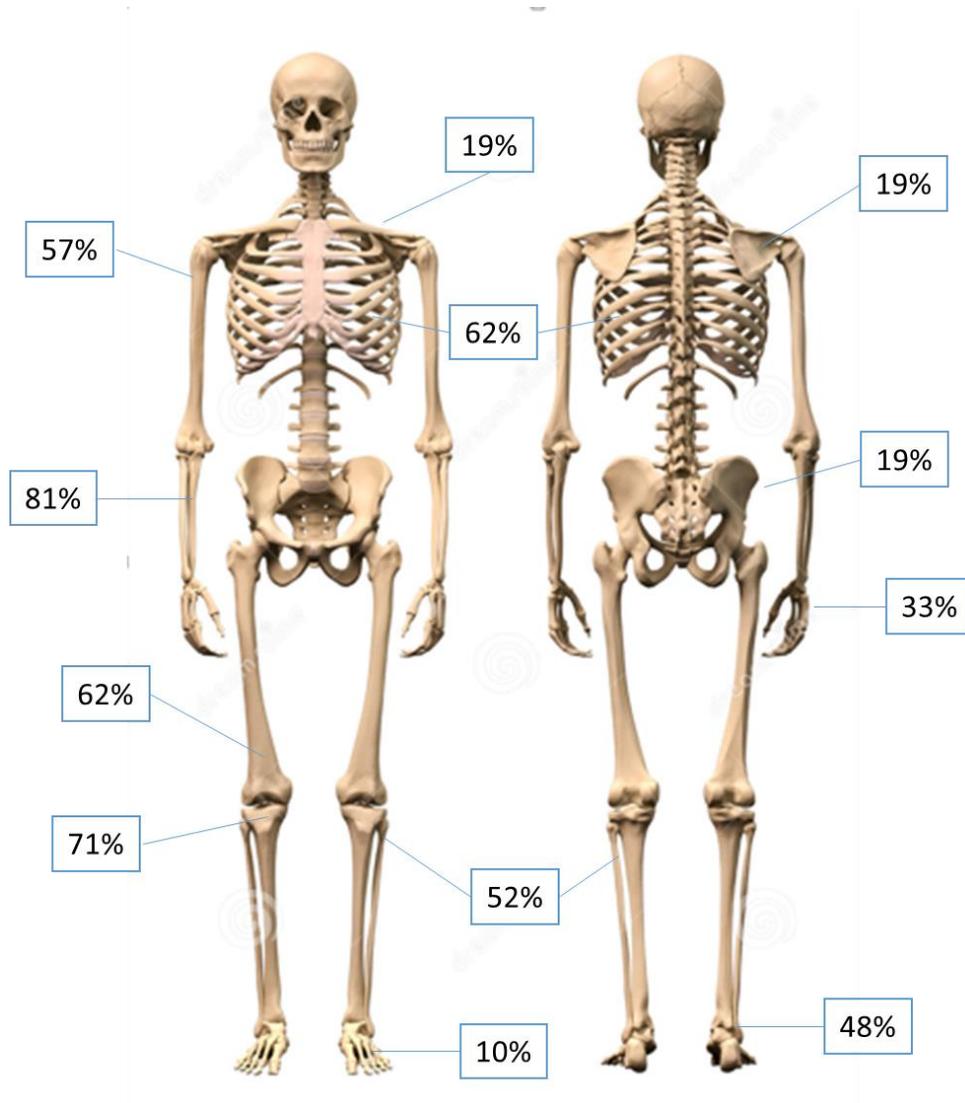


Figura 18 Esquema de la localización más frecuente de los osteocondromas en los pacientes con exostosis múltiple en este estudio.

En la figura 19, se presentan algunas de las radiografías de los 21 pacientes analizados en este estudio, donde se muestran osteocondromas de diferentes tamaños y localizaciones, así como deformaciones secundarias a estos.



Figura 19 Radiografías de algunos de los pacientes con exostosis múltiple estudiados. Obsérvese el tamaño de los osteocondromas y la deformidad que pueden ocasionar.

De las complicaciones producidas por los osteocondromas, 11 de los 21 pacientes analizados presentaron deformidades esqueléticas (52%), 2 tuvieron luxaciones secundarias a la deformidad producida por el osteocondroma (2%), 12 manifestaron dolor secundario a la compresión nerviosa (67%), 2 tuvieron talla baja (14%), 12 fueron sometidos a cirugías para resección de las exostosis (57%), y ninguno desarrollo malignización del osteocondroma (Fig 20).

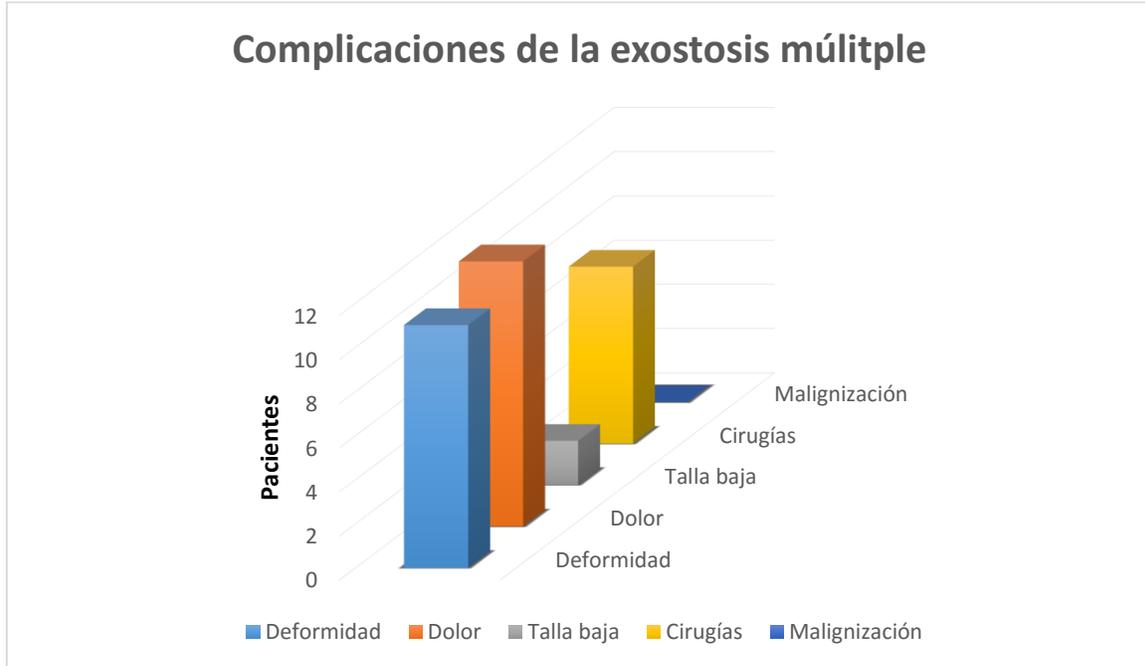


Figura 20 Gráfica de las complicaciones secundarias a exostosis múltiple en los 21 pacientes en los que se realizó el análisis del gen *EXT1*.

Al realizar el análisis de secuenciación del gen *EXT1*, se encontraron 26 variantes en 15 (58%) de los 21 de los pacientes estudiados. (Tabla 12). De las 26 variantes encontradas, solamente 2 se encuentran reportadas en la base de datos MOdb (Multiple Osteochondromas Mutation Database, (*EXT1 homepage - Multiple Osteochondroma Mutation Database - Leiden Open Variation Database*)). Dichas variantes son: c.G1019A (p.R340H) y c.G1761A (p.E587E) (Fig. 21 y 22). La primera variante es una mutación de sentido equivocado en el exón 2 que se ha asociado a exostosis múltiple. En tanto que la segunda corresponde a un polimorfismo en el exón 9, identificado como SNP rs7837891, y se encontró en estado homocigoto. Referente a este polimorfismo, el codón GAG tiene una frecuencia alélica global de 0.583 y el cambio por GAA de 0.417. En población con ancestría mexicana que radica en los Ángeles, California, EUA, es de 0.58 y 0.42 respectivamente, según el registro del

HapMap 3 (*HapMap Homepage*). Los 24 cambios no descritos resultan en mutaciones de sentido equivocado. De estas 20 fueron únicas y una (c.T1002G, p.C334W) se repitió en 4 pacientes no relacionados entre sí (Figura 23).

Tabla 12. Variantes encontradas en la secuencia del gen *EXT1* en la cohorte de pacientes con exostosis múltiple.

	Paciente	Exón	g. ADN	c.ADN	Proteína	Tipo de mutación
1	DMZE	1	g.G6086A	c.G313A	p.D105N	Sentido equivocado
2	DHB	1	g.G5943A	c.G170A	p.R57H	Sentido equivocado
3	HMRS	1	g.G5854T	c.G81T	p.Q27H	Sentido equivocado
4	MBR	1	g.C5949G	c.C176G	p.P59R	Sentido equivocado
5	RVJ	1	g.T5970C	c.T197C	p.V66A	Sentido equivocado
6	PTOB	1	g.A6378C	c.A605C	p.D202A	Sentido equivocado
7	PTOB	1	g.G6556C	c.G783C	p.K261N	Sentido equivocado
8	SGN	1	g.T6417C	c.T644C	p.M215T	Sentido equivocado
9	SGN	1	g.T6461A,	c.T688A	p.F230I	Sentido equivocado
10	ARMA	2	g.A279642T	c.A986T	p.H329L	Sentido equivocado
11	DJMS	2	g.T279658G	c.T1002G	p.C334W	Sentido equivocado
12	DHY	2	g. T279658G	cT1002G	p.C334W	Sentido equivocado
13	DHY*	2	g.G279675A	c.G1019A	p.R340H	Sentido equivocado
14	SJA	2	g.T279658G	c.T1002G	p.C334W	Sentido equivocado
15	USC	2	g.T279658G	c.T1002G	p.C334W	Sentido equivocado
16	LPP	2	g.A2796711C	c.A1055C	p.Q352P	Sentido equivocado

17	ARMA	6	g.C297048A	c.C1440A	p. F480L	Sentido equivocado
18	DHY	6	g. G297121C	c.G1513C	p.A505P	Sentido equivocado
19	HMRS	6	g.A297143T	c.A1535T	p.Q512L	Sentido equivocado
20	RMMF	6	g.T297021A	c.T1413A	p.N471K	Sentido equivocado
21	SGN	6	g.C297050G	c.C1442G	p.T481S	Sentido equivocado
22	HMRS	9	g.G309452T	c.C1732T	p.A578S	Sentido equivocado
23	MBR	9	g.A309458G	c.A1738G	p.T580A	Sentido equivocado
24	PTOB**	9	g.G309481A	c.G1761A	p.E587E	Polimorfismo
25	PTOB	9	g.A309506C	c.A1786C	p.S596R	Sentido equivocado
26	SGN	9	g.A309421C	c.A1721C	p. E574A	Sentido equivocado

* Variante previamente asociada a exostosis múltiple.

** Polimorfismo rs7837891 MAF en población de ancestría mexicana 0.42.

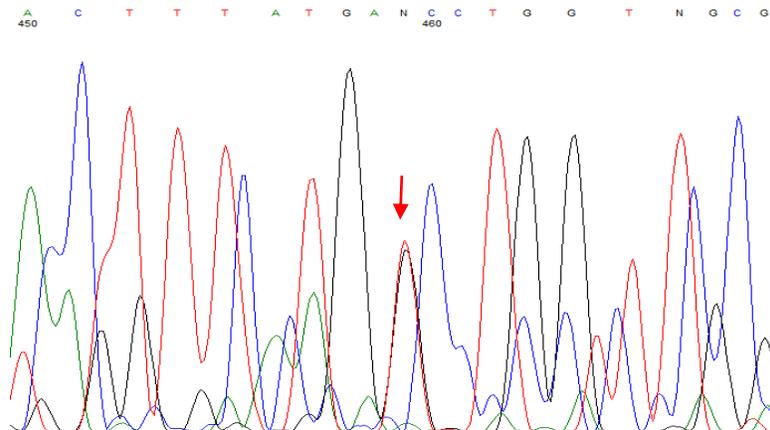


Figura 21 Electroferograma de la secuenciación del exón 2 de *EXT1* del paciente DHY, se encontró una mutación puntual c.G1019A (p.R340H), en estado heterocigoto, reportada previamente en la base de datos MOdb asociado a un paciente con exostosis múltiple.

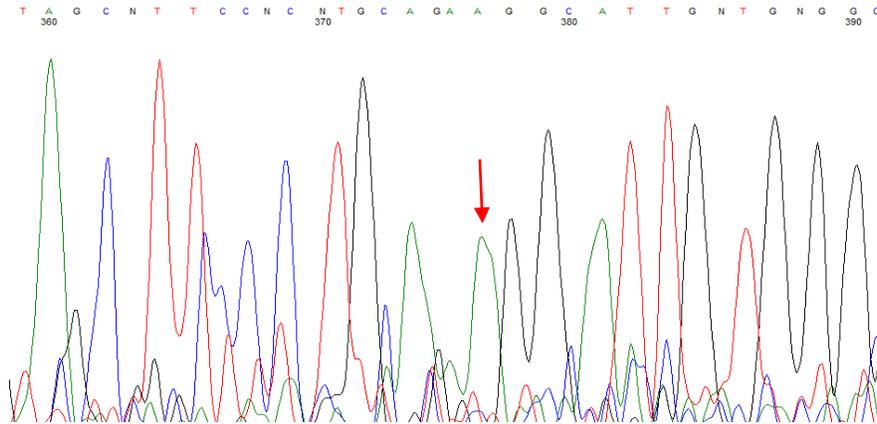


Figura 22 Electroferograma de la secuenciación del exón 9 de *EXT1* del paciente PTOB, se encontró polimorfismo (c.G1761A, p.E587E) en estado homocigoto, previamente reportado en la base de datos MObd, rs7837891.

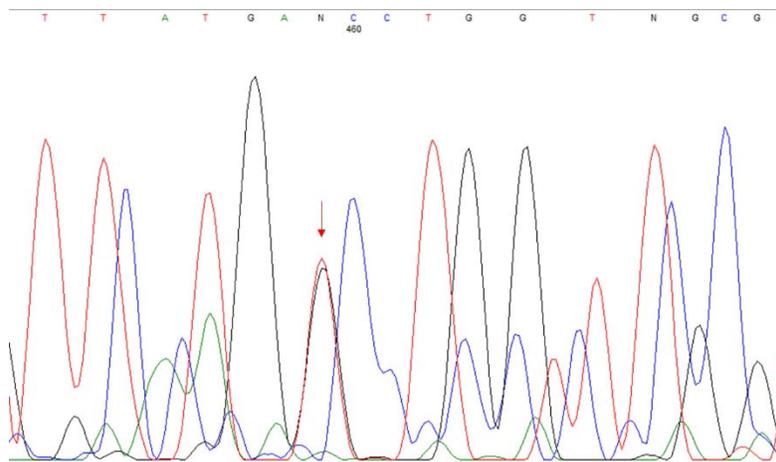


Figura 23 Electroferograma de la secuenciación del exón 2 de *EXT1* del paciente DHY, se encontró una mutación de sentido equivocado (c.T1002G), en estado heterocigoto, la cual se repite en otros 3 pacientes no relacionados.

Con el fin de evaluar el posible efecto patógeno de las nuevas variantes encontradas en la secuencia de ADN de nuestros pacientes, se realizó un análisis in silico usando un predictor bioinformático (*MutationTaster*). Se tomaron como referencia dos puntos principales, la predicción y el score. El valor de probabilidad indica la certeza de la predicción, un valor cercano a 1 indica un alto grado de "seguridad" del resultado predicho.

El puntaje o score, hace referencia al cambio de un aminoácido por uno nuevo. Se obtiene de una matriz de sustitución de aminoácidos (Matrix Grantham), que toma en cuenta las características físico-químicas de los aminoácidos y el puntaje es de acuerdo al grado de diferencia entre el aminoácido original y el nuevo. Las puntuaciones pueden variar desde 0,0 hasta 215. (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis in silico mediante el programa Mutation Taster, para conocer el efecto de las 26 variantes del ADN encontradas en este estudio.

c.ADN	Proteína	Predicción	Probabilidad	Score
c.G313A	p.D105N	Causante de enfermedad	0.999999887292278	23
c.G170A	p.R57H	Causante de enfermedad	0.999709691696183	29
c.G81T	p.Q27H	Causante de enfermedad	0.803357979301674	24
c.C176G	p.P59R	Causante de enfermedad	0.990103698838087	103
c.T197C	p.V66A	Polimorfismo	0.99024698842511	64
c.A605C	p.D202A	Causante de enfermedad	0.999999999283534	126
c.G783C	p.K261N	Causante de enfermedad	0.999999753856591	94
c.T644C	p.M215T	Causante de enfermedad	0.999999988234874	81
c.T688A	p.F230I	Causante de enfermedad	0.999999997691522	21
c.A605C	p.D202A	Causante de enfermedad	0.999999999283534	126
c.G783C	p.K261N	Causante de enfermedad	0.999999753856591	94
c.T644C	p.M215T	Causante de enfermedad	0.999999988234874	81
c.T688A	p.F230I	Causante de enfermedad	0.999999997691522	21
c.A986T	p.H329L	Causante de enfermedad	0.999999882909634	99
c.T1002G	p.C334W	Causante de enfermedad	0.99999999998257	215
c.G1019A	p.R340H	Causante de enfermedad	0.99999999980347	29
c.A1055C	p.Q352P	Causante de enfermedad	0.99999999974413	76
c.C1440A	p.F480L	Causante de enfermedad	0.999902204434722	22
c.G1513C	p.A505P	Causante de enfermedad	0.999999983089607	27
c.A1535T	p.Q512L	Causante de enfermedad	0.999999940212523	113
c.T1413A	p.N471K	Causante de enfermedad	0.907059907511964	94
c.C1442G	p.T481S	Causante de enfermedad	0.999999872019362	58
c.G1732C	p.A578S	Causante de enfermedad	0.99999999640309	99
c.A1738G	p.T580A	Causante de enfermedad	0.999999966386923	58
c.A1786C	p.S596R	Causante de enfermedad	0.999999995175652	110
c.A1721C	p.E574A	Causante de enfermedad	0.999999996488667	107

Se comparó las variantes encontradas en otro predictor bioinformático (PredictSNP analysis, <http://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/>) (Bendl et al., 2014). Este a su vez lo compara con otros predictores como MAPP, PhD-SNP, Polyphen, SIFT, SNAP y Panther, cada uno arroja la probabilidad de que los cambios puedan ser neutrales (polimorfismos) o ser deletereos (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis in silico que se realizó en PredictSNP analysis, Variantes deletérea (rojo), variantes neutras (verde) de acuerdo a otros predictores.

Mutación	MAPP	PhD-SNP	Poly-Phen-1	Poly-Phen-2	SIFT	SNAP	PANTHER
Q27H	-	72%	67%	79%	67%	62%	71%
P59R	73%	68%	59%	69%	76%	55%	71%
V66A	72%	68%	67%	87%	79%	77%	71%
D105N	66%	73%	67%	40%	70%	58%	-
D202A	59%	73%	67%	50%	43%	50%	48%
M215T	59%	51%	59%	56%	79%	50%	48%
F230I	57%	82%	74%	68%	79%	62%	-
K261N	74%	73%	67%	45%	45%	58%	-
H329L	77%	45%	67%	75%	81%	55%	62%
C334W	63%	89%	74%	81%	79%	81%	-
R340H	77%	68%	67%	50%	66%	61%	-
Q352P	66%	88%	74%	60%	79%	62%	66%
N471K	66%	78%	67%	79%	90%	71%	-
F480L	63%	88%	67%	40%	45%	55%	-
T481S	46%	51%	67%	55%	70%	61%	-
A505P	57%	88%	67%	63%	46%	81%	47%
Q512L	77%	59%	59%	40%	53%	55%	52%
E574A	77%	82%	67%	60%	79%	72%	56%
T580A	64%	83%	67%	68%	79%	58%	68%
S596R	65%	51%	67%	43%	71%	62%	49%

Discusión:

La exostosis múltiple es una enfermedad hereditaria relativamente frecuente, con un patrón de herencia autosómico dominante, es causada por la inactivación heterocigota de los genes *EXT1* y *EXT2*. En individuos afectados las mutaciones en *EXT1* y *EXT2* se reportan en el 56-78% y 21-44% respectivamente. Sin embargo, existe un porcentaje de pacientes en los cuales no se identifican mutaciones en estos genes por lo que se propone la existencia de un tercer gen asociado, posiblemente localizado en el cromosoma 19. Los productos génicos de los genes *EXT* tienen una función de supresores de tumores y están involucrados en la síntesis de sulfato de heparán. En distintas poblaciones estudiadas se reporta que el 56 al 78% de las mutaciones se encuentran en el gen *EXT1*. Las mutaciones pueden ocurrir a lo largo de todo el gen, sin embargo los exones 1, 2, y 6 son los principalmente afectados. Hasta el 80% de las mutaciones reportadas son de sentido equivocado, deleciones e inserciones que ocasionan corrimiento del marco de lectura, mutaciones que afectan el sitio de corte y empalme, lo que conlleva a que sus productos proteicos tengan una terminación y/o degradación prematura.

En este estudio se analizaron 21 pacientes con datos clínicos de exostosis múltiple, la edad promedio de diagnóstico fue de 8.5 años, con un rango de edad de 2 a 17 años. Estos datos son similares a lo reportado en la literatura mundial, que estima una edad promedio para el diagnóstico del ~50% a los 5 años, y el 80% a los 10 años (Andries et al., 2013; Jones et al., 2014). En 2 se observó un retraso en el diagnóstico entre los 22 y 50 años lo que ocasionó que los pacientes fueran sometidos a procedimientos riesgosos e innecesarios.

De acuerdo a los estudios clínicos en otras poblaciones, las zonas más afectadas son la región distal del fémur (90%), la región proximal de tibia (84%), peroné (76%) y húmero (72%), en la población de estudio se observó que las regiones corporales más afectadas fueron radio y cúbito (81%), en la articulación de la rodilla (71%), fémur (62%), región costal (62%), húmero (57%), tibia y peroné (52%), lo que es similar a lo reportado a nivel mundial.

Dentro de las complicaciones más frecuentemente encontradas las deformidades esqueléticas estuvieron presentes en un 52% de pacientes, seguida de dolor secundario a la compresión nerviosa con un 67%, debido a estas complicaciones el 57% de los pacientes fueron sometidos a cirugías para resección de las exostosis, cabe señalar que 8 pacientes (38%) son menores a 18 años, y según lo reportado en la literatura el 70% de los pacientes tienen una cirugía a la edad de 18 años,

Una de las complicaciones que llega a poner en riesgo la vida de los pacientes es la transformación maligna de los osteocondromas, lo cual ocurren en un 0.5-5% de los pacientes. En nuestra población de estudio no se observó transformación en ningún caso. Sin embargo, se debe considerar que la edad promedio en que ocurre la malignización es 34 años, dentro del grupo de pacientes, 16 (76%) están por debajo de esa edad por lo que es necesario realizar una vigilancia periódica a fin de detectar cualquier indicio de transformación maligna.

Se intentó clasificar el fenotipo de los pacientes en moderado o severo de acuerdo a la escala propuesta por la Sociedad de Tumores Musculo-esqueléticos (Francannet et al., 2001), sin embargo no fue posible ya que algunos datos clínicos no estaban registrados en el expediente. A pesar de esto, trataron de evaluarse algunos criterios de la escala, por ejemplo se detectó talla baja en 14% de los pacientes. El promedio de osteocondromas por paciente fue de 8, y hubo 7 pacientes que presentaron más 10 osteocondromas. Se observó compromiso de la

función relacionado al crecimiento de osteocondromas en 2 pacientes, por luxaciones secundarias a la deformidad.

En nuestra población se analizaron las secuencias de los exones 1, 2, 6 y 9 del gen *EXT1*, incluyendo las respectivas uniones exón/intrón. Se encontraron cambios la secuencia de ADN genómico en el 58% de los pacientes, la mayoría son cambios de sentido equivocado, que no se habían reportado previamente en las bases de datos revisadas. Este hallazgo corresponde a lo reportado en la literatura, ya que de las 713 variantes de *EXT1*, 432 son variantes únicas, lo que habla de un gran número de variantes privadas. Se realizó un análisis in silico usando dos predictores bioinformáticos para conocer el posible efecto de las variantes en la función de la proteína. Los resultados del análisis sugieren que la mayoría de estos cambios son deletéreos y por tanto probables mutaciones causantes de la enfermedad. Aunque estos resultados deben tomarse con cautela, consideramos conveniente confirmar las variantes en los pacientes y extender el estudio a los familiares de primer grado, para buscar intencionadamente las probables mutaciones. En caso de no encontrarse estas variantes en los familiares clínicamente sanos, sería conveniente el análisis de 100 cromosomas de individuos sin datos de exostosis múltiple para descartar que se trate de un polimorfismo en nuestra población, así se sentarían las bases para un estudio poblacional en mexicanos.

En un paciente se encontró la mutación de sentido equivocado c.G1019A (p.R340H) en estado heterocigoto, que ha sido previamente relacionada con exostosis múltiple. Esta mutación se encuentra en el exón 2 y se considera como un punto caliente del gen *EXT1*. Este cambio ha sido reportado 28 veces según la base de datos de exostosis múltiple (MOdb). Vale la pena mencionar que la mayor parte de individuos que portan esta mutación son de población caucásica, principalmente de Italia y Bélgica. Además se ha reportado en población de la India,

Japón y EUA. La detección de esta variante en diversas poblaciones hace pensar en que se trata de eventos independientes, lo que concuerda con las características de un punto caliente.

De manera interesante, se encontró el cambio c.T1002G (p.C334W) en 4 pacientes. Este no se ha descrito anteriormente y de acuerdo al análisis bioinformático es altamente probable que tenga un efecto deletéreo en la función de la proteína. Los pacientes en los que se encontró dicho cambio son originarios del D.F, Michoacán y 2 del Estado de México, y no tienen ningún parentesco entre sí. Además de la búsqueda en al menos 100 cromosomas de población sin datos de la enfermedad para descartar que se trate de un polimorfismo en población mexicana, se deben realizar estudios funcionales en modelos biológicos que confirmen una alteración en la función proteica para confirmar que se trata de la causa de la enfermedad.

El gen *EXT1* tiene 131 SNPs sinónimos en su región codificante, de acuerdo a la base de datos dbSNP (*dbSNP Home Page*). Llama la atención que sólo se identificó el SNP rs7837891 en un paciente en estado homocigoto. La MAF de este SNP reportada en población de ancestría mexicana que radica en EUA es de 0.42 lo que es muy parecido a la frecuencia mundial (0.417).

En resumen, este estudio presenta el análisis clínico y molecular de un grupo de pacientes con datos clínicos de exostosis múltiple, la edad de presentación y las complicaciones se presentaron acorde a lo reportado en la literatura. Llama la atención que se observaron diferencias en cuanto a las regiones corporales más afectadas, lo cual puede ser un efecto del tamaño del grupo estudiado o que algunos pacientes aún están en el grupo etario donde pueden seguir apareciendo osteocondromas. Se encontraron 26 variantes en la secuencia de *EXT1* en 15 (58%) individuos estudiados, de las cuales sólo dos han sido reportadas previamente, una

asociada a exostosis múltiple y la otra está considerada como un polimorfismo. Para conocer la relevancia de las otras 24 variantes se realizó un análisis bioinformático. Es necesario realizar una búsqueda en por lo menos 100 cromosomas de individuos sin datos clínicos de la enfermedad para descartar que se traten de polimorfismos en nuestra población.

Bibliografia:

- Ahn, J., Ludecke, H. J., Lindow, S., Horton, W. A., Lee, B., Wagner, M. J., ... Wells, D. E. (1995). Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nature Genetics*, *11*(2), 137–143. <http://doi.org/10.1038/ng1095-137>
- Alvarez, C., Tredwell, S., De Vera, M., & Hayden, M. (2006). The genotype-phenotype correlation of hereditary multiple exostoses. *Clinical Genetics*, *70*(2), 122–30. <http://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00653.x>
- Andries, R., Jan, F. A. S., & Lieven, A. (2013). Hereditary Multiple Exostosis. *Acta Orthopédica Belgica*, *79*, 597–607.
- Bendl, J., Stourac, J., Salanda, O., Pavelka, A., Wieben, E. D., Zendulka, J., ... Damborsky, J. (2014). PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations. *PLoS Computational Biology*, *10*(1), e1003440. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003440>
- Black, B., Dooley, J., Pyper, A., Reed, M. (1993). Multiple Hereditary Exostoses An Epidemiologic Study of an Isolated Community in Manitoba. *Clin. Orthop.*, *287*, 212–217.
- Bovée, J. V. M. G. (2008). Multiple osteochondromas. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *3*, 3. <http://doi.org/10.1186/1750-1172-3-3>
- Busse-Wicher, M., Wicher, K. B., & Kusche-Gullberg, M. (2014). The exostosin family: proteins with many functions. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *35*, 25–33. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.001>
- Chen, W.-C., Chi, C.-H., Chuang, C.-C., & Jou, I.-M. (2006). Three Novel EXT1 and EXT2 Gene Mutations in Taiwanese Patients with Multiple Exostoses. *Journal of the Formosan Medical Association*, *105*(5), 434–437. [http://doi.org/10.1016/S0929-6646\(09\)60143-1](http://doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60143-1)

- Cheung, P. K., McCormick, C., Crawford, B. E., Esko, J. D., Tufaro, F., & Duncan, G. (2001). Etiological point mutations in the hereditary multiple exostoses gene EXT1: a functional analysis of heparan sulfate polymerase activity. *American Journal of Human Genetics*, *69*(1), 55–66.
- Ciavarella, M., Coco, M., Baorda, F., Stanziale, P., Chetta, M., Bisceglia, L., ... D'Agruma, L. (2013). 20 novel point mutations and one large deletion in EXT1 and EXT2 genes: report of diagnostic screening in a large Italian cohort of patients affected by hereditary multiple exostosis. *Gene*, *515*(2), 339–48. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2012.11.055>
- Clement, N. D., Duckworth, A. D., Baker, A. D. L., & Porter, D. E. (2012). Skeletal growth patterns in hereditary multiple exostoses: a natural history. *Journal of Pediatric Orthopedics. Part B*, *21*(2), 150–4. <http://doi.org/10.1097/BPB.0b013e32834dd21f>
- Cuellar, A., & Reddi, a. H. (2013). Cell biology of osteochondromas: Bone morphogenic protein signalling and heparan sulphates. *International Orthopaedics*, *37*(8), 1591–1596. <http://doi.org/10.1007/s00264-013-1906-5>
- Delgado, M. a, Martinez-Domenech, G., Sarrión, P., Urreizti, R., Zecchini, L., Robledo, H. H., ... Asteggiano, C. G. (2014). A broad spectrum of genomic changes in latinamerican patients with EXT1/EXT2-CDG. *Scientific Reports*, *4*, 6407. <http://doi.org/10.1038/srep06407>
- El Gammal, A. T., Brüchmann, M., Zustin, J., Isbarn, H., Hellwinkel, O. J. C., Köllermann, J., ... Schlomm, T. (2010). Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *16*(1), 56–64. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1423>
- Francannet, C., Cohen-Tanugi, a, Le Merrer, M., Munnich, a, Bonaventure, J., & Legeai-Mallet, L. (2001). Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses. *Journal of Medical Genetics*, *38*(7), 430–434.

- Hameetman, L., Bovée, J. V., Taminiau, A. H., Kroon, H. M., & Hogendoorn, P. C. (2004). Multiple osteochondromas: clinico pathological and genetic spectrum and suggestions for clinical management. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 2(4), 161–173.
- Hameetman, L., David, G., Yavas, A., White, S. J., Taminiau, A. H. M., Hogendoorn, P. C. W., & Bov, J. (2007). Decreased EXT expression and intracellular accumulation of heparan sulphate proteoglycan in osteochondromas and peripheral chondrosarcomas. *Journal of Pathology*, 211, 399–409. <http://doi.org/10.1002/path>
- Hennekam, R. C. M. (1991). Hereditary multiple. *J Med Genet*, 28, 262–266.
- Huegel, J., Mundy, C., Sgariglia, F., Nygren, P., Billings, P. C., Yamaguchi, Y., ... Pacifici, M. (2013). Perichondrium phenotype and border function are regulated by Ext1 and heparan sulfate in developing long bones: a mechanism likely deranged in Hereditary Multiple Exostoses. *Developmental Biology*, 377(1), 100–12. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.02.008>
- Huegel, J., Sgariglia, F., Enomoto-iwamoto, M., Koyama, E., John, P., & Pacifici, M. (2014). Pathology : The Case of Hereditary Multiple Exostoses. *Developmental Dynamics*, 242(9), 1021–1032. <http://doi.org/10.1002/dvdy.24010>.Heparan
- Jamsheer, A., Socha, M., Sowińska-Seidler, A., Telega, K., Trzeciak, T., & Latos-Bieleńska, A. (2014). Mutational screening of EXT1 and EXT2 genes in Polish patients with hereditary multiple exostoses. *Journal of Applied Genetics*, 55(2), 1–6. <http://doi.org/10.1007/s13353-014-0195-z>
- Jennes I, Z. M. (2012). Identification and functional characterization of the promoter region of the human MSH6 gene. *Gene*, 492(1), 148–59. <http://doi.org/10.1002/gcc.1211>

- Jennes, I., Pedrini, E., Zuntini, M., Mordenti, M., Balkassmi, S., Asteggiano, C. G., ... Wuyts, W. (2009). Multiple osteochondromas: Mutation update and description of the Multiple Osteochondromas Mutation Database (MOdb). *Human Mutation*, 30(12), 1620–1627. <http://doi.org/10.1002/humu.21123>
- Jones, K. B., Pacifici, M., & Hilton, M. J. (2014). Multiple hereditary exostoses (MHE): elucidating the pathogenesis of a rare skeletal disorder through interdisciplinary research. *Connective Tissue Research*, 55(2), 80–8. <http://doi.org/10.3109/03008207.2013.867957>
- Kang, Q., Xu, J., Zhang, Z., He, J., Fu, W., & Zhang, Z. (2013). Mutation screening for the EXT1 and EXT2 genes in Chinese patients with multiple osteochondromas. *Archives of Medical Research*, 44(7), 542–8. <http://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.09.008>
- Kevin B. Jones. (2012). Glycobiology and the Growth Plate: Current Concepts in Multiple Hereditary Exostoses. *Journal of Pediatric Orthopedics. Part B Pediatric Orthop*, 31(5), 577–586. <http://doi.org/10.1097/BPO.0b013e31821c7738>.Glycobiology
- Kok, H. K., Fitzgerald, L., Campbell, N., Lyburn, I. D., Munk, P. L., Buckley, O., & Torreggiani, W. C. (2013). Multimodality imaging features of hereditary multiple exostoses. *The British Journal of Radiology*, 86(1030), 20130398. <http://doi.org/10.1259/bjr.20130398>
- Krooth, R. S., Macklin, M. T., & Hilbish, A. N. D. T. F. (1961). Diaphysial Aclasis (Multiple Exotoses) on Guam, 340–347.
- Matsumoto, K., Irie, F., Mackem, S., & Yamaguchi, Y. (2010). A mouse model of chondrocyte-specific somatic mutation reveals a role for Ext1 loss of heterozygosity in multiple hereditary exostoses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 10932–10937. <http://doi.org/10.1073/pnas.0914642107> /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914642107

- Mccormick, C., Duncan, G., Goutsos, K. T., & Tufaro, F. (1999). The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*, 668–673.
- Pannier, S., & Legeai-Mallet, L. (2008). Hereditary multiple exostoses and enchondromatosis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, *22*(1), 45–54. <http://doi.org/10.1016/j.berh.2007.12.004>
- Ropero, S., Setien, F., Espada, J., Fraga, M. F., Herranz, M., Asp, J., ... Esteller, M. (2004). Epigenetic loss of the familial tumor-suppressor gene exostosin-1 (EXT1) disrupts heparan sulfate synthesis in cancer cells. *Human Molecular Genetics*, *13*(22), 2753–65. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddh298>
- Sarrion, P., Sangorrin, a., Urreiziti, R., Artuch, R., Martorell, L., Armstrong, J., ... Grinberg, D. (2011). Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in patients with multiple osteochondromas from Spain. *Bone*, *48*, S157. <http://doi.org/10.1038/srep01346>
- Seitz, S., Rohde, K., Bender, E., Nothnagel, A., Ko, K., Schlag, P. M., & Scherneck, S. (1997). Strong indication for a breast cancer susceptibility gene on chromosome 8p12-p22 : linkage analysis in German breast cancer families, (October 1996), 1994–1996.
- Solomon, L. (1964). Hereditary Multiple Exostosis. *Am. J. Hum. Genet.*, *16*(3), 351–363.
- Stickens, D., Clines, G., Burbee, D., Ramos, P., Thomas, S., Hogue, D., ... Evans, G. A. (1996). The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nature Genetics*, *14*(1), 25–32. <http://doi.org/10.1038/ng0996-25>
- Stieber, J. R., & Dormans, J. P. (2005). Manifestations of Hereditary Multiple Exostoses, 110–120.

Trebicz-Geffen, M., Robinson, D., Evron, Z., Glaser, T., Fridkin, M., Kollander, Y., ... Nevo, Z. (2008). The molecular and cellular basis of exostosis formation in hereditary multiple exostoses. *International Journal of Experimental Pathology*, 89(5), 321–331. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00589.x>

dbSNP Home Page [online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>

EXT1 homepage - Multiple Osteochondroma Mutation Database - Leiden Open Variation Database a [online]. Disponible en:

http://medgen.uantwerpen.be/LOVDv.2.0/home.php?select_db=EXT1

HapMap Homepage [online]. Disponible en:

<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>

HGMD® home page [online]. Disponible en:

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

MutationTaster [online]. Disponible en:

<http://www.mutationtaster.org/>.