



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ**

**“Mutaciones somáticas en el Exón 17 del gen del receptor para
Angiopoyetina (*TEK*) en lesiones vasculares de pacientes
pediátricos”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS MEDICAS**

PRESENTA:

CARLOS ALBERTO SERRANO BELLO

TUTOR

**DR. FRANCISCO JESUS ARENAS HUERTERO
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

OCTUBRE DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**INDICE:**

RESUMEN.....	3
1 INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 TUMORES VASCULARES.....	6
1.2 MALFORMACIONES VASCULARES.....	7
1.3 ANGIOGÉNESIS.....	11
1.4 MUTACIONES EN EL EXON 17 DEL GEN <i>TEK</i> EN LESIONES VASCULARES.....	12
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	14
4 JUSTIFICACIÓN.....	15
5 OBJETIVO GENERAL.....	15
6 HIPÓTESIS.....	16
7 METODOLOGÍA.....	16
8 RESULTADOS	19
9 DISCUSION.....	24
10 BIBLIOGRAFÍA.....	26



RESUMEN

Introducción: Las lesiones vasculares son las alteraciones de tejidos blandos más frecuentes en la población pediátrica, y aunque su curso biológico y clínico en la mayoría de ellas es benigno, hasta un 5% de estas lesiones producen recurrencias grandes o de aparición en órganos vitales, las cuales pueden comprometer la función o la vida misma de los pacientes, es por ello que se han estudiado las vías de la angiogénesis. Estudios recientes indican que el receptor de la angiopoyetina-1 (Tie-2) tiene una participación importante en la vía de la vasculogénesis. Se demostró que las mutaciones en el exón 17 del gen que codifica para receptor de Angiopoyetina (*TEK*), alteran las funciones de éste, activando de manera constitutiva la vía de proliferación celular. Además, es preciso mencionar que estos hallazgos solo se han descrito en lesiones vasculares de pacientes adultos, en específico malformaciones vasculares en una proporción del 49%. En tumores de los niños, son pocos los casos demostrados con este tipo de mutaciones, es por ello que el objetivo de este trabajo fue conocer en qué proporción se encuentran presentes las mutaciones en el exón 17 en este tipo de tumores de pacientes pediátricos.

Metodología: Se revisó el banco de biopsias del archivo de patología con diagnóstico de lesiones vasculares, en el periodo comprendido entre 2007 al 2012. Los casos se reclasificaron en tumores y malformaciones vasculares, se obtuvieron las variables demográficas como edad, género y sitio anatómico de la lesión. A partir de un corte histológico de 8 μ M de cada caso se obtuvo DNA genómico, y se amplificó el exón 17 del gen *TEK* por PCR de punto final con *Taq* polimerasa de alta-fidelidad (*Pfu*). Finalmente se secuenciaron todos los fragmentos amplificados del exón 17 en busca de mutaciones, para posteriormente describir cada una dependiendo el tipo de lesión vascular (tumores o malformaciones), la diferencia de proporciones que exista, así como su relación con las variables demográficas.



Resultados: Se obtuvieron finalmente 48 casos con DNA óptimo en condiciones de secuenciar, que correspondieron a 27 tumores vasculares (56%) y 21 malformaciones vasculares (44%). Las lesiones vasculares se presentaron con mayor frecuencia en piel con 18 casos, seguidos por tejidos blandos con 17 y 13 lesiones tuvieron su origen en órganos sólidos. En lo que respecta al género, las lesiones vasculares fueron más frecuentes en hombres con 56% y 44% en mujeres. En cuanto a la edad, en las lesiones vasculares, fueron más frecuentes en pacientes de menos de 10 años, con una frecuencia de 75%. Se encontraron dos casos con mutaciones, estas correspondieron a malformaciones vasculares únicamente, con prevalencia de 10%. Ambas mutaciones fueron por un cambio de base y resultaban en cambio “missense” o de sentido equivocado, modificando la estructura final de la proteína. El primero caso se trató de un niño de 8 meses de edad con una lesión en tejidos blandos del cuello; y el segundo caso correspondió a un niño de 6 años con una malformación en órgano abdominal, en este caso en colon, en el primer caso en la posición 4 del exón 17 (2690) se reveló un cambio de una adenina por guanina; y el segundo caso en la posición 66 del exón 17 (2756), el cambio fue de timina por citosina. Al encontrar únicamente dos casos con mutaciones probablemente estén involucradas otras vías en la génesis de tumores vasculares en niños.



1. INTRODUCCIÓN.

Lesiones vasculares:

Las lesiones vasculares representan los tumores de tejidos blandos más frecuentes en la población pediátrica con una frecuencia reportada de hasta 10% aproximadamente³⁰. Los avances en el conocimiento y entendimiento de la histogénesis y patogénesis de estas lesiones han llevado a la separación de estas en dos importantes grupos: los tumores vasculares y las malformaciones. La sociedad internacional para el estudio de las anomalías vasculares recomienda que el término de tumor vascular se aplique a aquellas lesiones cuyo origen resulte de la proliferación celular descontrolada y rápida, que da como resultado la neo formación de vasos sanguíneos. Y, por otro lado, las malformaciones vasculares, en contraste, son resultado de un desarrollo anormal de los vasos sanguíneos en etapas embrionarias, los cuales se desarrollan in útero y típicamente son evidentes desde el nacimiento. Las lesiones vasculares pueden estar compuestas por cualquier combinación entre arteria; vena; capilares o linfáticos.³¹

Tanto los tumores como las malformaciones vasculares pueden ocurrir en cualquier parte del cuerpo, con presentación clínica variable, pueden ser superficial (piel) o profunda (tejidos blandos y vísceras) y dependiendo del tamaño pueden ser incapacitantes tanto física como emocionalmente. El tamaño de estas lesiones puede ser variable, desde pocos centímetros hasta lesiones grandes que involucren extremidades completas o inclusive limitar la función de órganos vitales. La mayoría de estas lesiones tienen un comportamiento benigno e inclusive algunas variedades histológicas tienden a involucionar con la edad, sin embargo, hasta en un 4%-5% recurren y requieren de múltiples resecciones quirúrgicas y tratamientos prolongados lo que imposibilita una función adecuada de articulaciones, extremidades u órganos.^{4,5}



1.1 TUMORES VASCULARES

1.1.1 Hemangiomas

Los hemangiomas son los tumores de tejidos blandos más frecuentes de la infancia con una frecuencia de 7 a 10% de los recién nacidos³⁰. Los hemangiomas pueden estar presentes desde el nacimiento (30%), aunque en su mayoría aparecen en las dos primeras semanas de vida. Su aspecto físico dependerá de la profundidad, es decir, en el sitio anatómico donde se encuentre, además del tamaño y del estadio evolutivo (proliferación o involución). Según su localización, los hemangiomas se dividen en: superficiales; los que afectan a la dermis papilar, que clínicamente tienen un color rojo; o profundos, los que afectan a la dermis reticular y al tejido adiposo subcutáneo, que suelen tener un color azulado y una consistencia dura y renitente.¹

Habitualmente, los hemangiomas se presentan como una lesión única, pero hasta en un 20% las lesiones pueden ser múltiples (angiomatosis), situación en la que hay que descartar una afectación a órganos internos.

A pesar de que pueden ocurrir en cualquier localización, la presentación más frecuente es la cabeza y el cuello (80%) seguida del tronco y extremidades (20%), y como hemos mencionado puede afectar órganos internos.⁽³⁾

En estadios tempranos de la lesión, esta crece rápidamente, puede ocasionar dolor, malestar local e incapacidad física. A partir de los 10-12 meses, los hemangiomas suelen involucionar, el tiempo de regresión es variable entre 4 y 12 años.⁽⁴⁾

Finn y Glowacki analizaron una serie de 298 hemangiomas, y los clasificaron en dos grupos respecto a la involución: aquellos que involucionaban antes de los 6 años (38%), persistía una cicatriz, o telangiectasias. Para aquéllos que no involucionaron antes de los 6 años persistió una deformidad cosmética grave⁽⁵⁾.



Hay que tener en cuenta que hay reportes en los que sólo la mitad de las lesiones involucionan a los 6 años ⁽⁴⁾ y que sólo el 40% lo hace de una manera aceptable.

1.2 MALFORMACIONES VASCULARES

Las malformaciones vasculares son lesiones benignas, no tumorales, presentes siempre desde el nacimiento ⁽⁵⁾. Tienen una incidencia de 1-5%, la mayoría de predominio venoso ⁽¹¹⁾, estas lesiones se presentan en ambos sexos, sin distinción. Las malformaciones vasculares no tienen una regresión espontánea, crecen lentamente a lo largo de la vida. Estas lesiones que progresivamente aumentan el diámetro de los vasos, pero no el número. Las malformaciones vasculares son alteraciones del desarrollo embrionario de los vasos sanguíneos que se han atribuido a mutaciones esporádicas. En el año 2012 se reportaron mutaciones en el gen que codifica para el receptor de tipo tirosina cinasa Tie-2, que son consistente en un aumento de la actividad del receptor. El Tie-2 es esencial para el desarrollo vascular temprano y un incremento de su actividad puede producir un crecimiento anormal del plexo vascular primario. ⁽¹³⁾

Limaye y Vikkula, fueron de los primeros en identificar las mutaciones en el exón 17 del gen TEK que codifica para el receptor Tie-2 humano. Describieron ocho sustituciones simples en el exón 17 del gen TEK en pacientes con malformaciones venosa esporádicas. Las mutaciones somáticas en el exón 17 del receptor cinasa de tirosina de las células endoteliales Tie-2 (codificada por TEK) se identificaron en el 49% de los pacientes con malformaciones venosas. ⁽¹⁷⁾.

1.3 Clasificación de lesiones vasculares.

Para la división entre malformaciones y tumores vasculares se utiliza la clasificación de la ISSVA, (International Society for the Study of Vascular Anomalies), Tabla 1. Las malformaciones vasculares se dividen en función del vaso afectado, es decir: capilares o vénulas (mancha en vino de Oporto), venosas, linfáticas, y combinadas.

Tabla 1: Clasificación de Lesiones vasculares (ISSVA)

Tumores vasculares:	Malformaciones vasculares
<ul style="list-style-type: none"> a) Hemangioma infantil b) Hemangiomas congénitos c) Tumores vasculares adquiridos d) Hemangioma microvenular e) Hemangioma glomeruloide, etc f) Hemangioendotelioma kaposiforme g) Angioma en penachos h) otros 	<ul style="list-style-type: none"> a) Malformaciones de flujo lento: CM; VM; LM b) Malformaciones de flujo rápido: AM; AVF; AVM. c) Malformaciones combinadas: CVM; CLM; LVM; CVLM; AVM-LM; CM-AVM.
<p>A, Arteria, AV arteriovenoso, C capilar, F fistula, L linfático, M malformación, V venoso.</p>	

Cada una de las lesiones vasculares presentan características clínicas, hemodinámicas las cuales presentan mayor o menor grado de recurrencias y complicaciones sistémicas propias. ^(1,2)

En cuanto a los tumores, existen diferentes tipos bien caracterizados en esta clasificación, sin embargo, existen algunas características histológicas distintivas en los hemangiomas de pacientes pediátricos. Una de ellas que se presenta principalmente el hemangioma capilar, es la presencia de células endoteliales epitelioides que muchas veces forman nidos sólidos sin formación de luces vasculares que pueden confundirse con otro tipo de neoplasias. Otras características son el crecimiento de los hemangiomas, que son muy localizados principalmente en tejidos blandos de estos, el tejido adiposo subcutáneo y el músculo estriado, son sitios comunes para la presentación de este tipo de neoplasias. Se ha podido caracterizar en lesiones pediátricas algunas características histológicas que han permitido dividir en dos fases el crecimiento de este tipo de tumores, una fase temprana o proliferativa donde se observan un mayor número de canales vasculares, y una fase involutiva o de regresión en la que se pueden observar pequeños trombos, algunos pueden estar recanalizados, calcificaciones y remplazo de las áreas vasculares por fibrosis, hay además algunas variantes que como ya se mencionó, tienen características puntuales o distintivas como los hemangioma epitelioides y en penacho.(Fig1)

Las malformaciones vasculares desde el punto de vista histológico son lesiones en su mayoría de tejidos blandos profundos su nombre y características histológicas dependerán del o los vasos que le den origen, es decir, puede haber malformaciones vasculares originadas en vasos venosos linfáticos y arteriales, o la combinación entre estos, vasos linfáticos anastomosados a vasos linfáticos, etc. La imagen histológica está representada por canales vasculares irregulares, en su mayoría de distintos tamaños y formas, que pueden anastomosarse entre sí. (Fig. 2)

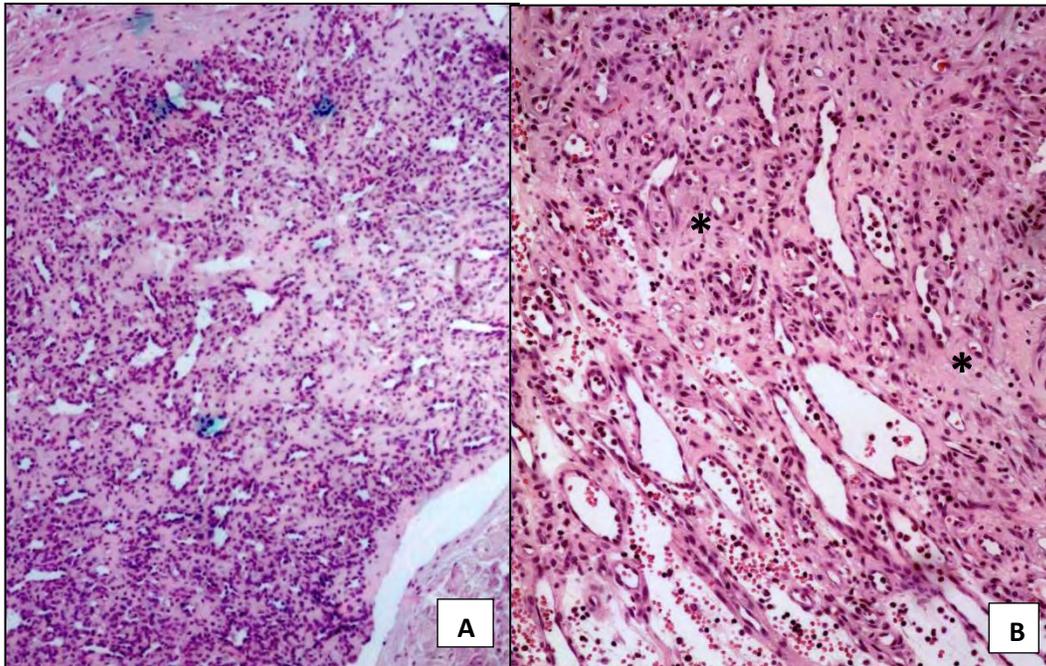


Fig1: A Hemangioma de espalda de un preescolar constituida por proliferación de canales vasculares de aspecto capilar. B se observan areas de involución caracterizadas por el depósito de tejido fibroconectivo (*).

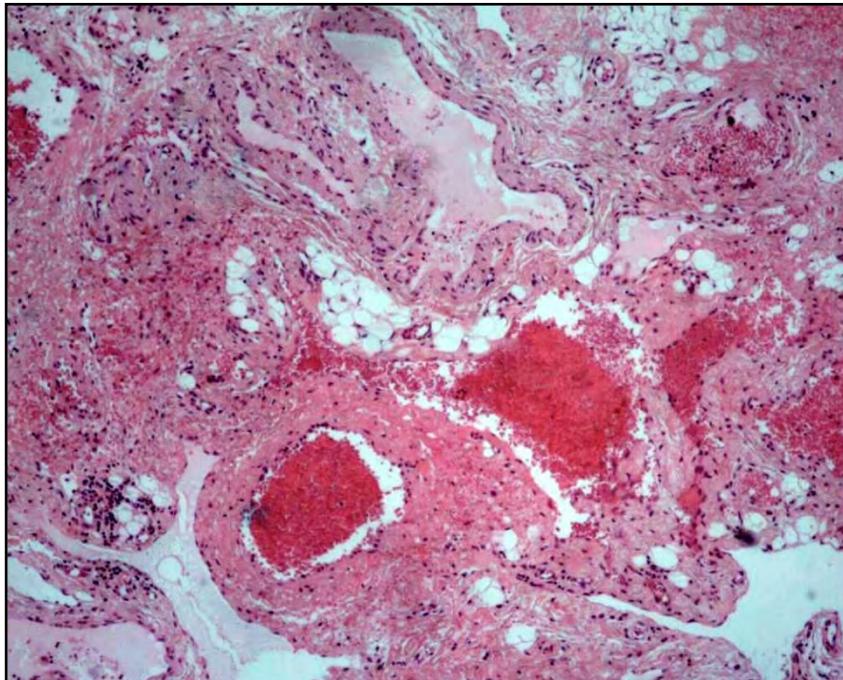


Fig2: Malformación vascular compuesta por vasos de aspecto venoso (*) entremezclados con vasos de paredes muscularizadas de aspecto arterial (flecha), esta lesión corresponde a una malformación arteriovenosa en el miembro pélvico de un niño de 3 años.



1.3 ANGIOGÉNESIS: RECEPTOR TIE-2:

Se han estudiado distintas vías que expliquen la proliferación vascular en lesiones vasculares, para ello hay que entender las principales vías moleculares de la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso por el cual hay una neo formación de vasos sanguíneos, dicha formación es mediada por una serie de factores moleculares, bioquímicos y ambientales. En las lesiones vasculares se han identificado más de 10 genes que participan en la angiogénesis, estos incluyen: *RASA1*, *CCM123*, *GLMN*, *TEK*, *VEGFR3*, *FOXC2*, *SOX18*, *ACVRLK1* y *MADH4*, estos genes participan tanto en tumores vasculares hereditarios como en malformaciones vasculares.^{18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29}. A pesar de ello, la etiología y las vías moleculares exactas de los tumores vasculares o malformaciones vasculares no están del todo estudiadas. A nivel molecular la vasculogénesis y la angiogénesis embrionaria es resultado de una serie de eventos genéticos que dependen de la expresión ordenada de dos grupos o conjuntos de receptores de tirosincinasa; el primero o evento temprano tienen que ver con la diferenciación y proliferación del endotelio, el segundo grupo con la formación y morfogénesis vascular¹⁵. Los eventos tempranos de vasculogénesis son dependientes del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y del factor de crecimiento endotelial (VEGF) A y B. La diferenciación de las células endoteliales es determinada a su vez por el VEGF C y la expresión del receptor VEGFR3 determina la diferenciación a linfáticos o vasos sanguíneos¹⁵. Para continuar y perpetuar tanto el crecimiento como el moldeamiento endotelial y vascular es necesario de la presencia de otro conjunto de receptores de tirosincinasa los Tie-1 y Tie-2. El ligando para Tie-2 es la angipoyetina 1 que tiene un papel crítico en la inducción de los componentes de la red vascular.^(12, 13,15) figura 1.

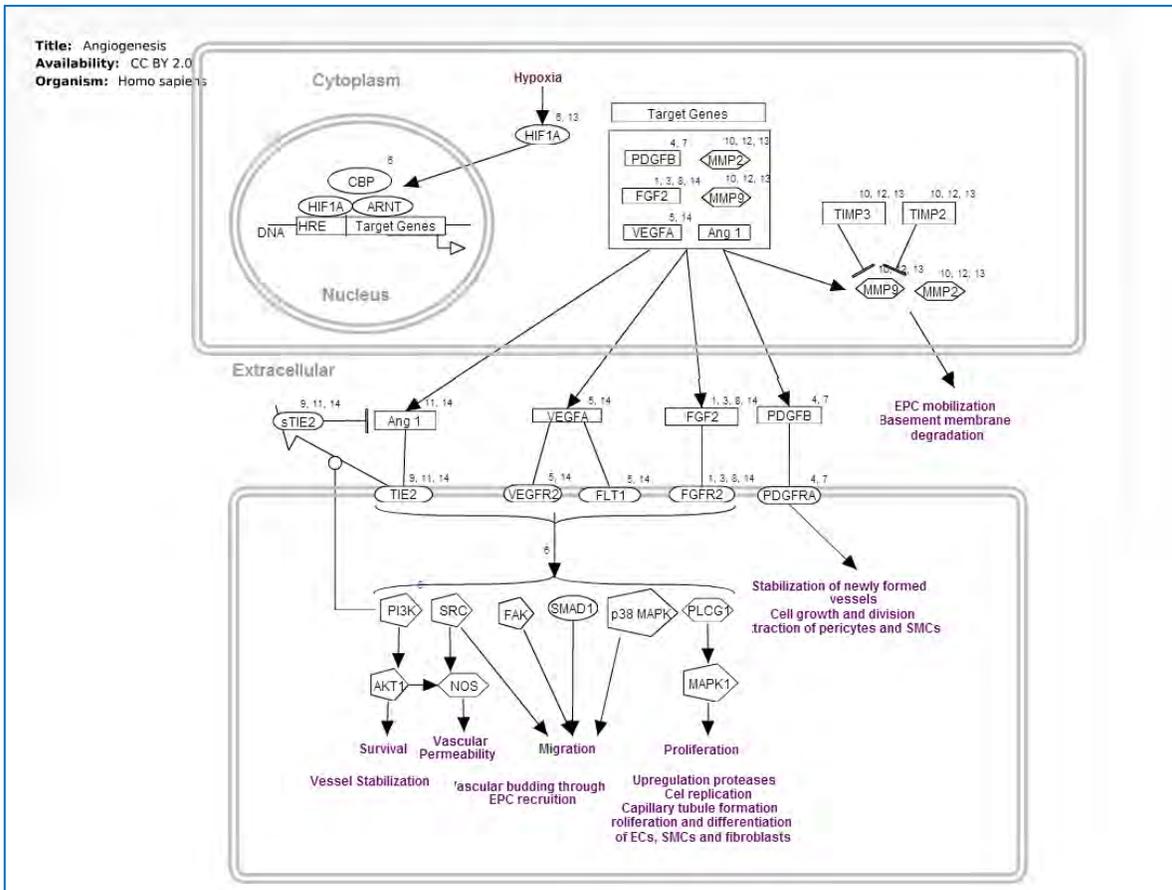


Figura 3: Vías moleculares de la angiogénesis. Muestra la participación del receptor Tie-2 en las vías de proliferación celular en el endotelio de los vasos, mediante la activación por su ligando de angiopoyetina. Tomado de Am J Med Gen 2002; 108: 265-274.

1.3.1 MUTACIONES EN EL EXON 17 DEL GEN *TEK* EN LESIONES VASCULARES.

El receptor Tie-2 de tipo tirosina cinasa se expresa exclusivamente en células endoteliales en seres humanos. El receptor Tie-2 tiene una actividad tirosina cinasa que al ser activado por su ligando, la angiopoyetina, esta desencadena los mecanismos moleculares que tienen como fin la trascrición genómica que culmina con la angiogénesis. Este receptor es codificado por el gen *TEK* que se localiza el brazo corto del cromosoma 9 región 21. Está constituido por 4127 pares de bases y consta de 23 exones. Este receptor contribuye de forma esencial en la

remodelación vascular durante la angiogénesis en la etapa embrionaria y en el mantenimiento de la integridad vascular de vasos en la edad postgestacional.¹⁸. Este receptor está conformado por un dominio extracelular y uno intracelular. El primero lo conforman 2 asas de tipo inmunoglobulinas separadas por 3 secuencias repetidas de tipo factor de crecimiento epidérmico que están conectados a su vez por un dominio de tipo III de fibronectina. La región o asa intracelular está conformada por dos dominios tipo tirosin-cinasa separados por un espaciador de tipo cinasa (Fig 4). El ligando para este receptor es la angiopoyetina-1, cuya vía de señalización parece ser crítica en la activación de las células endoteliales y células de musculo liso en la morfogénesis venosa.⁽¹⁷⁾

Actualmente se han reportado 8 diferentes tipos de mutaciones de sentido equivocado en el exón 17 del gen *TEK*. Además de una delección en el extremo amino terminal de *TEK*. Las mutaciones más frecuentes son en la región que codifica para el dominio intracelular del receptor con actividad de tirosín-cinasa, lo que genera una proteína fosforilada de manera constitutiva, y en consecuencia la señalización activa para diferentes procesos, entre ellos los de proliferación celular.¹⁶⁾

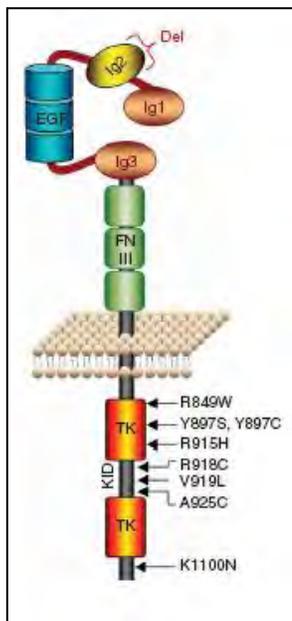


Fig4: Estructura del receptor Tie y las mutaciones encontradas en el dominio intracelular.(Tomado de: Ye C, Pan Somaticmutations in exon 17 of the TEK gene in vascular tumors and vascular malformations. J Vasc Surg. 2011 Dec; 54(6):1760-8.)



Se identificaron dos mutaciones somáticas de *TEK* (Y897C, R915C) en tumores vasculares y siete mutaciones somáticas de *TEK* en malformaciones vasculares (Y897H, Y897C, L914F, R915C, S917I, R918C, R918H). La mayoría de las mutaciones son sustituciones simples, el 100% para los tumores vasculares y 88,6% para las malformaciones vasculares, mientras que el resto son sustituciones dobles ⁽¹⁶⁾. Actualmente no solo se han descrito estas mutaciones en las malformaciones venosas, sino además se han identificado en algunos otros subtipos de anomalías vasculares, incluyendo los tumores vasculares (hemangioma infantil, granuloma piógeno, y hemangioma epitelioides) y otros tipos de malformaciones vasculares (malformación capilar, malformación arteriovenosa, malformaciones linfáticas- capilar, y malformación arteriovenosa).^{16,17} Estos estudios se llevaron a cabo principalmente en pacientes adultos. En lesiones vasculares de niños prácticamente no hay estudios que describan este tipo de mutaciones.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han identificado mutaciones en el exón 17 del gen *TEK* que codifica para la región intracitoplásmica del receptor para angiopoyetina Tie-2 en el 49 % de las malformaciones vasculares de pacientes adultos; sin embargo, son pocos los casos reportados con mutaciones del exón 17 en tumores de pacientes pediátricos.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál es la frecuencia de mutaciones del exón 17 del gen *TEK* en las malformaciones y tumores vasculares de pacientes pediátricos?



4. JUSTIFICACIÓN

Los tumores y malformaciones vasculares son las lesiones de tejidos blandos más comunes en los niños, con una alta incidencia anual (10%). La mayoría son lesiones benignas, sin embargo, tienen un alto impacto en la salud física y emocional de los niños, además de ser recurrentes algunas de ellas e incapacitantes si afectan estructuras u órganos vitales. Es por ello que se han estudiado las vías moleculares que participan en la angiogénesis, las cuales todavía no son del todo comprendidas. Entre ellas se encuentran las mutaciones en exón 17 de gen *TEK* que causan alteraciones del receptor Tie-2, que, a su vez, desencadena una proliferación celular sostenida. Sin embargo, en los tumores vasculares pediátricos no se han realizado estudios que demuestren la presencia de mutaciones del exón 17 del gen *TEK*. Además, en un futuro será importante documentar la asociación de este receptor como elemento participante en el proceso de señalización de la proliferación vascular, y posteriormente proponerlo como un blanco terapéutico.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar las mutaciones somáticas en el exón 17 del gen *TEK* (Tie -2) en lesiones vasculares (malformaciones y tumores) de pacientes pediátricos.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir como se distribuye la presencia de las mutaciones de acuerdo a las variables demográficas (edad, género, localización).
- Describir la frecuencia de lesiones vasculares según la localización, edad y género.
- Comparar la frecuencia de mutaciones y sus tipos en los dos tipos de lesiones



6. HIPÓTESIS

Las lesiones vasculares de pacientes pediátricos tendrán una frecuencia similar (49%) de mutaciones del exón 17 del gen *TEK* a la observada en pacientes adultos.

7. METODOLOGIA

7.1 Tipo de estudio: Transversal, descriptivo.

7.2 *Obtención de las muestras.*

Las muestras de estudio se obtuvieron del banco de biopsias diagnosticadas como lesiones vasculares de pacientes pediátricos, de distintos sitios anatómicos, tanto de tejidos blandos, como de piel, mucosas y órganos sólidos, las cuales fueron fijadas en formol e incluidas en parafina. Se analizó un periodo de 5 años (del 2007 al 2012), para completar un tamaño de la muestra de 94 casos. Este número de casos se obtuvo para una diferencia de proporciones con una confiabilidad de 0.05, una precisión de 0.1, y una proporción obtenida de estudios previos de 49%.

7.2.1 Criterios de inclusión

Biopsias de tumores y malformaciones vasculares diagnosticadas en el Departamento de Patología del Hospital Infantil de México, que cuente con tejido incluido en parafina. Que se cuente con el expediente clínico completo.

7.2.2 Criterios de no inclusión.

Pacientes con síndromes genéticos conocidos que presenten lesiones vasculares.

Material genético (DNA) insuficiente o de mala calidad.



7.3 Clasificación de las lesiones vasculares.

Se clasificaron en lesiones y tumores vasculares, tomando en cuenta los criterios de la ISSVA (International Society for the Study of Vascular Anomalies), Tabla 1.

7.4 Extracción del DNA genómico.

Una vez clasificados los casos se procedió a la obtención del DNA genómico a partir de un corte de 8 μ M del bloque de parafina utilizando el siguiente método:

1. El corte se desparafinó en 2 incubaciones con 500 μ L de xileno a 40° C, y 2 baños con 500 μ L de alcohol etílico absoluto. Se dejó secar el tejido posterior al último paso de alcohol.
- 2.- Se procedió a la digestión del tejido con 180 μ l de buffer de lisis: Tris pH 8.3, 10 mM, EDTA 5 mM, SDS 5%; y 20 μ l de proteinasa K; durante 1 día a 37° C.
- 3.- Posteriormente se centrifugó a 5 000 rpm/1min, se tomó el sobrenadante y se precipitó el DNA con 200 μ L de isopropanol a -20° C durante una noche.
- 4.- Se colectó el DNA por centrifugación a 5 000 rpm/1min y se secó a 37° C por 5 min. Se resuspendió en 20 μ l de agua libre de nucleasas, se cuantificó la concentración y se evaluó la pureza de DNA en un espectrofotómetro en un Nanodrop, Genova Nano de JENWAY.

7.5 Amplificación y secuenciación del exón 17.

Del DNA extraído de cada caso se amplificó el exón 17 completo del gen TEK que consta de un fragmento de 191 pby se utilizó el siguiente par de iniciadores:

TEK-F: 5'AGCTGTTCA GGG CCA CTG ATG 3'.

TEK-R: 5'TAG AGG GAA CTC CAC AGG GAA 3'.

Las condiciones de amplificación del exón 17 fueron las siguientes:



En un micro tubo con 500ng de DNA, se agregó 3 μ l de 10 mM de ambos primers, 2 μ L de una mezcla de los dNTPs, 5 μ L del amortiguador 10X de la Polimerasa, 4 μ L de MgCl₂, y 0.25 μ l de *Taq* polimerasa y agua para completar 50 μ l de la reacción. Para obtener la amplificación, la reacción se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler de BIO-RAD con el siguiente programa:

Desnaturalización: 94°C durante un minuto.

Ciclos propiamente de la reacción en cadena que consistieron de:

Desnaturalización: 94° C durante 1 min.

Alineamiento: 60°C durante 1 min.

Extensión: 72°C durante 2 min.

La repetición de este ciclo se realizó 40 veces.

Una vez obtenidos los fragmentos del exón 17 amplificados, se corrieron en geles de agarosa para comprobar la amplificación del exón. Se purificaron en columnas de QIAGEN y se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica en la CDMX.

De esta manera se identificarán las posiciones y tipo de mutaciones con el software de Clustal X y corroborados en BLAST.

7.6 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

Se realizó estadística descriptiva (promedio y porcentaje) para describir la frecuencia de mutaciones y para medir la frecuencia entre grupo etario (mayor y menor de 10 años), localización (piel, tejidos blandos y órganos) y el tipo de lesión.



8. Resultados

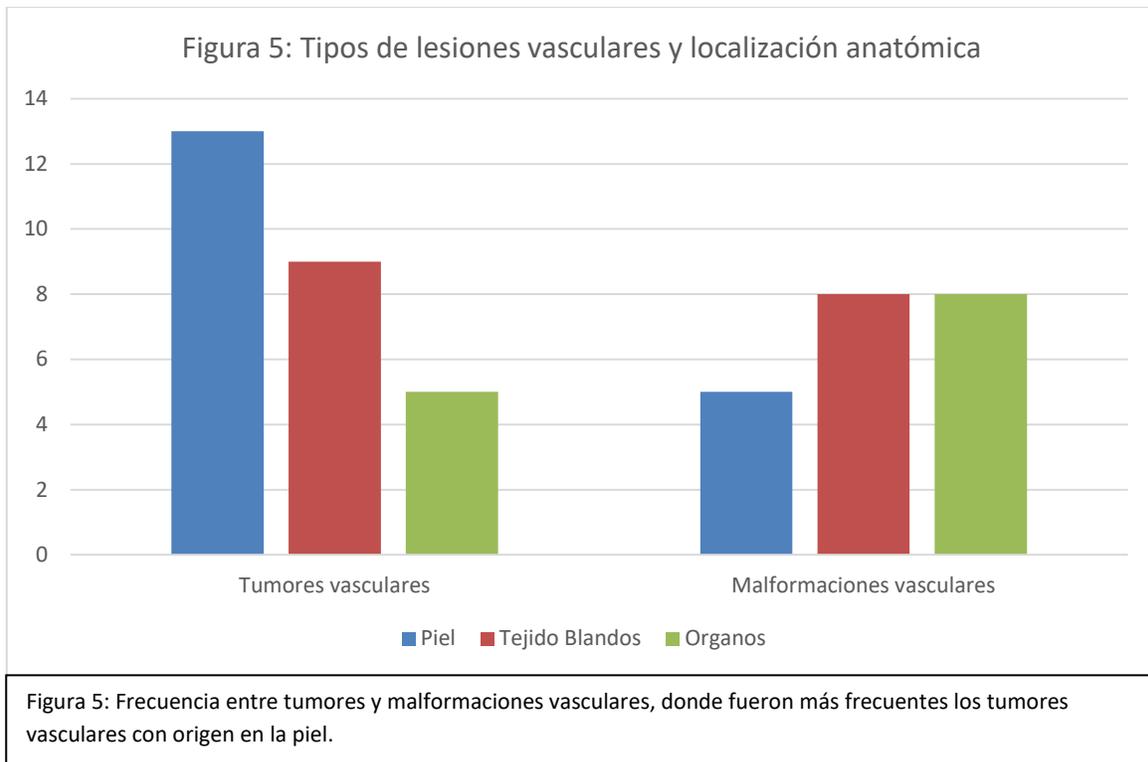
Se obtuvieron 48 casos con DNA viable (porque amplificaron sin problemas un fragmento del gen constitutivo gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, GAPDH) y en concentración de DNA requerida para realizar la reacción de amplificación. Los 48 casos finales correspondieron a 27 tumores vasculares y 21 malformaciones (Tabla 2).

Tipo de lesión	Número de casos (n)	Porcentaje (%)
Tumor vascular	27	56
Malformación	21	44

En términos generales las lesiones vasculares se presentaron con mayor frecuencia en piel con 18 casos, seguidos por tejidos blandos con 17 y 13 lesiones tuvieron su origen en órganos sólidos. (Tabla 3).

Localización	Número de casos (n)	Porcentaje (%)
Piel	18	38
Tejidos blandos	17	35
Órganos sólidos	13	27

Las malformaciones vasculares presentaron una distribución en la que los sitios más frecuentes fueron los tejidos blandos y órganos sólidos con 8 casos cada uno, la piel fue el sitio menos frecuente con 5 casos. Mientras que para los tumores vasculares el sitio más frecuente de aparición fue la piel con 13 casos, tejidos blandos con 9 casos ocupó el segundo lugar, y por último los órganos sólidos fueron los sitios de presentación menos frecuente con 5 casos.



En lo que respecta al género, las lesiones vasculares fueron más frecuentes en hombres con 56% y 44% en mujeres. En cuanto a la edad, en las lesiones vasculares, fueron más frecuentes en pacientes de menos de 10 años, con una frecuencia de 75%. (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Número de casos con lesiones vasculares según la edad.		
Grupos de edad	Casos	Porcentaje (%)
< 10 años	36	75
>10 años	12	25



Genero	Casos	Porcentaje (%)
Mujer	21	44
Hombre	27	56

Para los tipos de lesión y su distribución de acuerdo al género, se encontró que para tumores vasculares se presentaron en 14 hombres y 13 mujeres, en las malformaciones 13 casos correspondieron al sexo masculino y 8 al femenino. (Tabla 6).

Los resultados encontrados por tipo de lesión y edad fueron: para los tumores vasculares 18 casos se presentaron en menores de 10 años y 9 casos para mayores de 10, en cuanto a las malformaciones, para pacientes mayores de 10 se encontraron 18 casos y tres para menores de 10 años. (Tabla 7).

	Género Frecuencias (%)	
	Mujer	Hombre
Tumores	13	14
Malformaciones	8	13

	Tipo de Lesión Vascular	
	Tumor	Malformación
<de 10 años	18	18
>de 10 años	9	3

De los 48 casos en que se logró secuenciar el exón 17, solo se encontraron dos casos con mutaciones, estas correspondieron a malformaciones vasculares únicamente. La prevalencia encontrada en relación al total de lesiones vasculares es del 4.6%, en cuanto a la presencia de mutaciones en el rubro de las malformaciones vasculares esta correspondió a 10%. El primero caso se trató de un niño de 8 meses de edad con una lesión en tejidos blandos del cuello; y el segundo caso correspondió a un niño de 6 años con una malformación en órgano abdominal, en este caso en colon. (Tabla 8).

Caso	Tipo de lesión	Edad	Sexo	Localización	Tipo de mutación
47	Malformación vascular	8 meses	H	Tejidos blandos del cuello	Y897C.(Heterocigota)
85	Malformación vascular	6 años	H	Mesocolon	R918C. (Heterocigota)

Ambas lesiones mostraron una sola mutación, las cuales fueron simples: en el primer caso en la posición 4 del exón 17 (2690) se reveló un cambio de una adenina por guanina; y el segundo caso en la posición 66 del exón 17 (2756) el cambio fue de timina por citosina (Figuras 6 y 7).

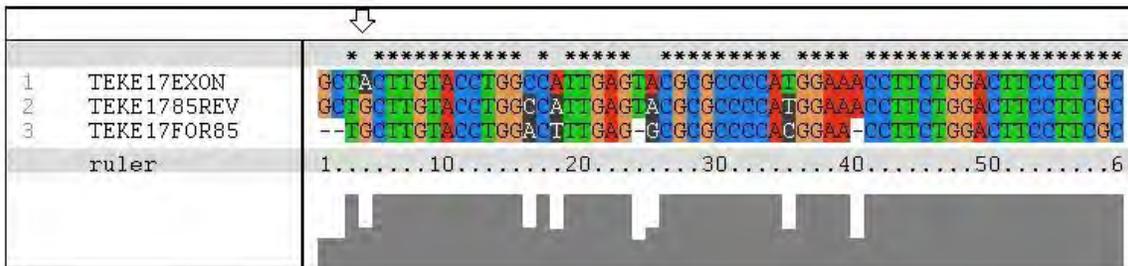


Figura 6. Mutaciones mostradas (flecha) con un cambio de base de Guanina por Adenina (A>G en posición 2690) que predicen la mutación Y897C en la proteína Tie-2.

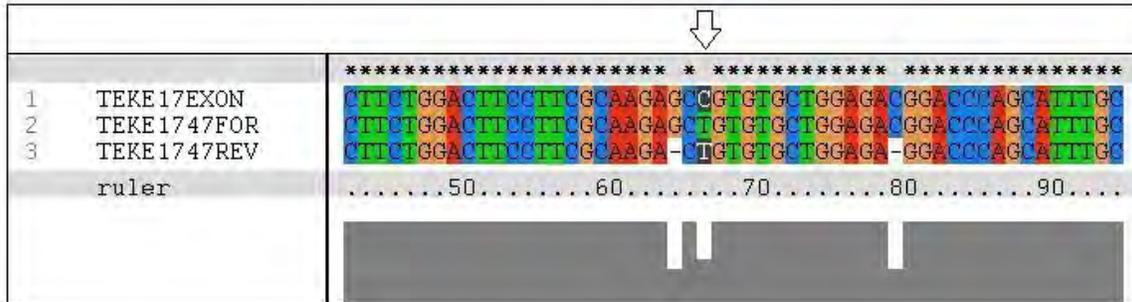


Figura7. Muestra (flecha) un cambio de base de T por C (T>C en posición 2752) que predice la mutación R918C en la proteína Tie-2.

Ambas mutaciones producen un cambio de sentido equivocado o “missense”. La primera Y897C hay un cambio de aminoácido de tirosina por cisteína. La segunda la R918C hay un cambio de arginina por cisteína. Las proteínas resultantes de ambas mutaciones tienen significado patológico, ya que tienen un efecto de variación en función de la proteína, calculado sobre la base de la homología de secuencia y la similitud físico-química entre los aminoácidos alternativos.

Tabla 8: Tipos de mutaciones y cambios en los aminoácidos codificantes.								
Residuo	Variación ID	Tipo	Alelos	Código ambiguo	Residuos	Codones	Tamizaje	Poli fenotipo
897	Rs80338909	missense	A/G/G	V	Y,C	TAC, TCC	0	0.991
918	ADK23809.1	missense	C/T/T	V	R,C		0	0.990



9. Discusión:

Los Hemangiomas y las malformaciones vasculares son concebidas como alteraciones o lesiones vasculares de biología diferente, los hemangiomas son tumores benignos, que se origina por crecimiento no controlado de las células endoteliales, en cambio las malformaciones vasculares no son verdaderas neoplasias, sino una alteración o defecto de la morfogénesis vascular causada por una disfunción en la embriogénesis y la vasculogénesis (Finn, et al 1983; Restrepo et al, 2011). Debido a la apariencia clínica, características radiológicas e histopatológicas y al comportamiento biológico, los hemangiomas y las malformaciones vasculares tienen un tratamiento y pronóstico diferente. Se ha estudiado distan vías de angionesis para los dos tipos de lesiones vasculares donde destacan el receptor para angipoyetina 1, Tie2 codificado por el gen TEK, que es esencial tanto para la remodelación y diferenciación vascular en etapas embrionarias, e indispensable en la angiogénesis y mantenimiento de la integridad celular vascular en etapas postnatales (Fukuhara et al., 2008). Estudios recientes han demostrado mutaciones en el gen TEK principalmente en el exón 17 que codifica para el receptor de angipoyetina-1 con función de tipo tirosina cinasa (Tie2) estas mutaciones se han identificado en malformaciones vasculares principalmente (Limaye et al., 2009, Wouters et al , 2010 ; Soblet et al , 2013a.); Limaye identificó ocho mutaciones somáticas en el exón 17 de TEK: 2690A> G (Y897C), 2690A> T (Y897F) y 2740C> T (L914F),: 2545C> T (R849W), 2752C> T (R918C), 3314C> A (T1105N) y 3316A> C (T1106P), en 28 de 57 individuos (49,1%) con malformaciones vasculares. Soblet (Soblet et al., 2013b) identifico mutaciones en 17 de 30 casos (56,7%) también en malformaciones vasculares, incluyendo las mutaciones detectadas previamente. YE (Brahmi et al., 2013) identificaron dos mutaciones TEK somáticas (Y897C, R915C) en 4 de 23 (17,4%) tumores vasculares evaluados y 7 mutaciones somáticas TEK (Y897H, Y897C, L914F, R915C, S917I, R918C, R918H) en 35 de 106 (33,0%) VM evaluado. El R918C (2752C> T) y R918H (2753G> A). En otro estudio se demostró que las



malformaciones vasculares presentes en piel y mucosas están ligados a la mutación R849W en Tie2 (Shu et al., 2012).

El objetivo de este trabajo fue la búsqueda de mutaciones presentes en el exón 17 del receptor TEK en tumores y malformaciones vasculares en pacientes pediátricos. Las lesiones vasculares ocupan el primer lugar de tumores de tejidos blandos más frecuentes en la edad pediátrica ^(1, 2, 3, 4, 5), la mayoría de ellas tienen un comportamiento benigno, sin embargo, hay lesiones que tienen recurrencia; crecen de forma importante o se localizan en órganos que pueden comprometer su función⁹.

Nuestros resultados mostraron que la prevalencia es baja: ninguna en tumores vasculares 0% y 10% en malformaciones vasculares, por lo que sugiere fuertemente que al menos en ese exón de este receptor son muy raras las mutaciones en lesiones pediátricas, tomando en cuenta que probablemente sea un número de muestra muy bajo o que no todos los tipos de malformaciones presentan esta mutación. Probablemente tendría que tomarse en cuenta la localización, tamaño del tumor o inclusive otras variables como tiempo de evolución o antecedente familiares de lesiones vasculares. Las mutaciones presentes en este estudio correspondieron a 10% de este grupo. La primera mutación fue Y897C, la cual se ha reportado por distintos autores todos ellos en malformaciones vasculares (Limaye et,al. 2009) Liyame la reporto en una mujer de 62 años en tejidos blandos del tobillo y una mujer de 23 años en tejidos blandos el codo. En nuestro caso se localizó en un niño de 8 meses en tejidos blandos de cuello. Para el segundo caso, la mutación fue otra mutación reportada, la R918C, ésta correspondió a un niño de 6 años y la lesión la presentó en el mesocolon, aquí es de interés ya que es una lesión que se produjo intrabdominal, lo cual en estudios previos no se ha reportado. Ambas mutaciones fueron descritas anteriormente las cuales se comprobó que cambian la estructura de los dominios intracelulares del receptor Tie-2.



A pesar de que en nuestro estudio la frecuencia es baja, a diferencia de lo reportado en la literatura en los cuales se encontraron mutaciones en hasta 45% de los casos en pacientes adultos asiáticos^{16, 23}. Esto puede indicar que en lesiones de pacientes pediátricos o por lo menos en etapas tempranas del desarrollo de las lesiones, las mutaciones en este exón probablemente no sean un factor predominante para la génesis y el crecimiento de dichas lesiones, ya que se han reportado estudios en los que no se han encontrado mutaciones en TEK en malformaciones vasculares (N. Brahami, M. Aribi, 2013), además que pueden estar implicados otros exónes, 23 o 25, como los reportados por Ye (Ye et al, 2011) u otros genes como RASA 1 que se ha edificado en malformaciones principalmente muco-cutáneas o del sistema nervioso central (R. Thiex, J.B. Mulliken, 2013). Sería importante demostrar si estas alteraciones son más frecuentes en lesiones con recurrencia; o que con el tiempo puedan aumentar de tamaño. Por lo que se pudo observar, las mutaciones encontradas predominan en las malformaciones sin tener claro si la localización y/o género estén relacionados con la presencia de las mutaciones. Es conveniente señalar que sería de suma importancia comprobar por medio de inmunohistoquímica u otro método, si realmente en los pacientes con malformaciones vasculares, el receptor realmente este activado sin la necesidad de un ligando, o que realmente no sea tan importante la actividad de este receptor en la génesis de posibles malformaciones vasculares. Proponemos entonces que se estudie más a fondo el tipo de malformaciones, el tiempo de evolución y evidenciar la actividad del receptor (actividad de tirosin-cinasa) para angiopoyetina (TEK) para relacionar este como un factor importante en la génesis de malformaciones vasculares en población pediátrica.



10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mulliken JB, Glowacki J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *PlastReconstrSurg* 1982; 69: 412.
2. Mulliken JB. Vascular malformations of the head and neck. Mulliken JB, Young AE (eds): *Vascular birthmarks: Hemangiomas and vascular malformations*. Philadelphia: WB Saunders, 1988
3. Chiller KG, Passaro D, Frieden IJ. Hemangiomas of infancy. Clinical characteristics, morphologic subtypes, and their relationship to race, ethnicity, and sex. *Arch Dermatol* 2002; 138: 1567-1576.
4. Bowers RE, Graham EA, Tomlinson KM. The natural history of the strawberry nevus. *Arch Dermatol* 1960; 82: 667-670.
5. Finn MC, Glowacki J, Mulliken JB. Congenital vascular lesions: clinical application of a new classification. *J PediatrSurg* 1983; 18: 894-900.
6. Alessi E, Bertani E, Sala F. Acquired tufted angioma. *Am J Dermatopathol* 1986; 8: 426-429.
7. Hebeda CL, Scheffer E, Starink TM. Tufted angioma of late onset. *Histopathology* 1993; 23: 191-193.
8. Weiss SW, Enzinger FM. Spindle cell hemangioendothelioma: a low grade angiosarcoma resembling cavernous hemangioma and Kaposi's sarcoma. *Am J SurgPathol* 1986; 10: 521-530.
9. Perkins P, weiss SW. Spindle-cell hemangioendothelioma, an analysis of 78 cases with reassessment of its pathogenesis and biologic behavior. *Am J SurgPathol* 1996; 20: 1196-1204.
10. Fletcher CDM, Beham A, Schmid C. Spindle cell haemangioendothelioma: a clinicopathological and immunohistochemical study indicative of a non-neoplastic lesion. *Histopathology* 1991; 18:
11. Eifert S, Villavicencio JL, Kao TC, Taute BM, Rich NM. Prevalence of deep venous anomalies in congenital vascular malformations of venous predominance. *J VascSurg* 2000; 31: 462-471.



12. Vikkula M, Boon L, Carraway KL 3rd, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B et al. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 1996; 87: 1181-1190.
13. Sato T, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessels formation. *Nature* 1995; 376: 70-74.
14. Gorham LW, Stout AP. Massive osteolysis (acute spontaneous absorption of bone, phantom bone, disappearing bone): its relations to hemangiomas. *J Bone Joint Surg* 1955; 37: 986-1004.
15. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91:3527,1998.
16. Ye C, Pan L, Huang Y, Ye R, Han A, Li S, Li X, Wang S. Somatic mutations in exon 17 of the TEK gene in vascular tumors and vascular malformations. *J Vasc Surg*. 2011 Dec; 54(6):1760-8.
17. Limaye N, Wouters V, Uebelhoer M, et al. Somatic mutations in angiopoietin receptor gene TEK cause solitary and multiple sporadic venous malformations. *Nat Genet*. 2009 Jan; 41(1):118-24.
- 18.- Eerola I, Boon LM, Mulliken JB, Burrows PE, Domp Martin A, Watanabe S, et al. Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations. *Am J Hum Genet* 2003;73:1240-9.
19. Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, et al. Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet* 1999;23:189-93.
20. Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, Huang E, Zawistowski JS, Stoffer T, et al. Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 2003;73:1459-64.
21. Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, et al. Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 2005;76:42-51.
22. Brouillard P, Boon LM, Mulliken JB, Enjolras O, Ghassibé M, Warman ML, et al. Mutations in a novel factor, glomulin, are responsible for glomuvenous malformations ("glomangiomas"). *Am J Hum Genet* 2002;70:866-74.



23. Vikkula M, Boon LM, Carraway KL, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, et al. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 1996;87:1181-90.
24. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, et al. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet* 2000;25:153-9.
25. Fang J, Dagenais SL, Erickson RP, Arlt MF, Glynn MW, Gorski JL, et al. Mutations in FOXC2 (MFH-1), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;67:1382-8.
26. Irrthum A, Devriendt K, Chitayat D, Matthijs G, Glade C, Steijlen PM, et al. Mutations in the transcription factor gene SOX18 underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia. *Am J Hum Genet* 2003;72:1470-8.
27. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 1994;8:345-51.
28. Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, et al. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 1996;13:189-95.
29. Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* 2004;363:852-
30. Burton Bk, Schulz Cj, Angle B, Burd li. Anincreased incidence of haemangiomas in infants born following chorionic villussampling (CVS). *Prenat Diagn* 1995; 15: 209-214.
31. Cohen Mm Jr. Vasculogenesis, angiogenesis, hemangiomas, and vascular malformations. *Am J Med Gen* 2002; 108: 265-274.
32. Limaye N. Classification and Tie2 mutations in spinal and soft tissue vascular anomalies. *Gene* 2015; 571: 91–96.
33. Mei Zhoua, et al. *Human Molecular Genetics*, 2007, 16: 140–149.
- Bogdanovic et al., 2009



- 34.- N. Brahami, M. Aribi, B.E. Lack of TEK gene mutation in patients with cutaneomucosal venous malformations from the North-Western Region of Algeria. *Genet. Res. Int.* (2013), p. 784789
- 35.- A. George, V. Mani, A. Noufal. Update on the classification of hemangioma. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, 18 (2014), pp. 117–120.
- 36.- R. Kollipara, L. Dinneen. Current classification and terminology of pediatric vascular anomalies. *AJR Am. J. Roentgenol.*, 201 (2013), pp. 1124–1135
- 37.- W. Shu, Y. Lin, R. Cutaneomucosal venous malformations are linked to the TIE2 mutation in a large Chinese family. *Exp. Dermatol.*, 21 (2012), pp. 456–457
- 38.- J. Soblet, N. Limaye, M. Uebelhoer, L.M. Boon, M. Vikkula. Variable somatic TIE2 mutations in half of sporadic venous malformations. *Mol. Syndromol.*, 4 (2013), pp. 179–183
- 39.- R. Thiex, J.B. Mulliken, N. Revencu. A novel association between RASA1 mutations and spinal arteriovenous anomalies. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, 31 (2010), pp. 775–779.
- 40.- D. Yamakawa, H. Kidoya, Ligand-independent Tie2 dimers mediate kinase activity stimulated by high dose angiopoietin-1. *J. Biol. Chem.*, 288 (2013), pp. 12469–12477.
- 41.- C. Ye, L. Pan, Y. Huang, R. Ye, A. Han, S. Li, X. Li, S. Wang. Somatic mutations in exon 17 of the TEK gene in vascular tumors and vascular malformations. *J. Vasc. Surg.*, 54 (2011), pp. 1760–1768.