

DELGADO, MARIA ANDRE  
Estudio clinico, bio

2014

73189

## **Agradecimientos**

A mis padres, quienes aunque no estuvieron físicamente durante el transcurso de esta tesis, pero me acompañaron internamente siempre, y quienes me dieron la posibilidad de estudiar y que con su ejemplo y esfuerzo me ayudaron permanentemente a intentar cumplir con mis sueños.

A mi hermana quien me acompaña y está presente en todo momento, por entenderme, por su gran generosidad y por transmitirme siempre entusiasmo y optimismo.

A mi directora de tesis, Dra Carla Asteggiano por darme la posibilidad de trabajar en su grupo de investigación en CDG, por su entusiasmo y dedicación, por acompañarme y por compartir tantos buenos momentos no sólo en el ámbito académico. Muchas gracias por brindarme la posibilidad de viajar y de tener la experiencia de compartir y trabajar en conjunto con grupos de investigación internacionales y por incluirme como una más en su familia y compartir tan buenas experiencias.

A la Dra Raquel Dodelson de Kremer por darme la oportunidad de formar parte del Centro de Estudio de las Metabopatías Congénitas (CEMECO), permitiéndome conocer el mundo del estudio de las enfermedades metabólicas hereditarias, por brindarme sus conocimientos y el ejemplo a través de su gran dedicación, perseverancia y compromiso con los pacientes.

A mi codirectora la Dra Cecilia Greco, por brindarme su confianza, paciencia y a quien le debo su gran colaboración a la distancia en la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Al Comité de seguimiento de tesis: Dra. Gabriela Previtali, Dra. Nori Tolosa de Talamoni y Dr. Héctor Gauna. Les agradezco por sus sugerencias, consejos y la buena predisposición en todo momento a acompañarme durante este periodo.

A todos los integrantes de CEMECO, especialmente a Ana y Alicia por recibirme en el área de enzimología, por su confianza y paciencia, por transmitirme sus conocimientos y experiencia en el estudio de las enfermedades metabólicas y por los buenos momentos vividos.

Al grupo de CDG, quienes me acompañaron durante este tiempo, Beatriz, Mauricio y Gustavo, a quienes no solo les debo sus tan importantes aportes en aspectos técnicos e informáticos, sino por haber compartido tantos momentos cotidianos que quedarán siempre en mí recuerdo.

A todos los integrantes de CEMECO quienes no están actualmente pero que compartieron momentos muy importantes durante y posteriormente a mi transcurso en este centro de investigación.

Especialmente quisiera agradecer a Adriana, por las charlas y consejos, a Nydia por su generosidad y colaboración, a Dora por sus consejos brindándome ayuda para seguir adelante. A Laura con quien hemos compartido el camino hacia el hospital repetidas veces y por su mirada siempre positiva; a Cynthia, Silene, Julia y Leila por incluirme siempre, no solo en el laboratorio. A Sandra, Adriana B, Carola, Miriam, Celia, Romina y Adriana C por su colaboración constante y por los momentos compartidos.

Quiero agradecer especialmente al Dr Daniel Grinberg y a la Dra. Susana Balcells que contribuyeron en mi formación, por su orientación y gran generosidad, por abrirme las puertas en su grupo de investigación en el Departamento de Genética en la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, con quienes no solamente pude desarrollar aspectos experimentales fundamentales para mi trabajo de tesis, sino que me brindaron un gran afecto y calidez humana, compartiendo experiencias maravillosas durante mis estancias en Barcelona. Le agradezco a su grupo de investigación especialmente a Patricia, Roser y Mónica por su colaboración, dedicación y paciencia.

A Silvia por darme la bienvenida y recibirme tantas veces en Barcelona, por ser parte de algún modo también de este proyecto, aportando su gran generosidad, afecto y por tan buenos momentos compartidos.

A mis amigas que me recibieron siempre en Río Cuarto, Guille, Cecilia y Ana Laura, gracias por su afecto, generosidad y buenos momentos compartidos.

A mis compañeras de la vida y a mis amigas de siempre de Río Cuarto, por estar presentes desde diferentes destinos acompañándome y transmitiéndome alegría y cariño más allá de la distancia y del paso del tiempo.

Al Dr. Florencio Segura, la Dra. Lorena Zecchini y al Dr. Hugo Robledo por su colaboración en los aspectos clínicos y de bioimágenes indispensables para este estudio y además, por su afecto, paciencia y por su ayuda incondicional.

A la Dra. Mabel Brunotto por su paciencia y su gran colaboración en los estudios estadísticos realizados para esta tesis.

Al grupo de trabajo del Dr Hugo Lujan por permitirme desarrollar el procesamiento de tejidos en su laboratorio.

Agradezco al Ministerio de Salud de la Nación (Beca Carrillo Oñativia), al Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), a la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT) por permitir formación científica con dedicación exclusiva durante estos años, contribuyendo mediante las diferentes becas de formación doctoral obtenidas. Al Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), de Barcelona, por el financiamiento otorgado colaborando con el desarrollo de este trabajo.

Quiero agradecer especialmente a todos los pacientes con osteocondromatosis y a sus familiares que participaron de este estudio, por su interés y colaboración. Espero que esta tesis les haya brindado una herramienta que permita responder a sus inquietudes y además, desde el aspecto humano, les haya permitido sembrar esperanzas mediante el entendimiento de esta enfermedad y perspectivas a posibles tratamientos en el futuro.

A TODOS MUCHAS GRACIAS

**Tesis Doctoral**

**ESTUDIO CLÍNICO, BIOQUÍMICO Y MOLECULAR EN PACIENTES CON  
EXOSTOSIS MÚLTIPLE HEREDITARIA(EXT1/EXT2-CDG) DEBIDO A  
ALTERACIONES EN LOS GENES EXT1 Y EXT2**

Por

**Bioq. María Andrea Delgado**

Para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Exactas, Fisicoquímicas y Naturales  
Universidad Nacional de Río Cuarto

**Directora**

**Dra. Carla Gabriela Asteggiano**

**Investigadora CONICET**

**Co-Directora**

**Dra. Cecilia Rosa Greco**

**Comisión asesora**

**Dr. Héctor Gauna**

**Dra. Nori Tolosa de Talamoni**

**Dra. Gabriela Previtali**

**Lugar de Trabajo**

Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas- CEMECO  
Hospital de Niños de la Santísima Trinidad  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad Nacional de Córdoba

**2014**

08187

73189

73189

INT-N:
Clasif:
T. 051

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>1. Formación de Glicoconjugados</b> .....	<b>15</b>
1.1 N-Glicosilación.....	16
1.2 O-Glicosilación.....	17
<b>2. Importancia de los Glicoconjugados</b> .....	<b>18</b>
2.1 Glicosaminoglicanos.....	¡Error! Marcador no definido.19
2.2 Proteoglicanos.....	20
2.3 Proteoglicanos de heparán sulfato.....	21
<b>3. Desórdenes Congénitos de la Glicosilación</b> .....	¡Error! Marcador no definido.22
3.1 Clasificación de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación.....	23
3.2 Manifestaciones clínicas en patologías debidas a Desórdenes Congénitos de Glicosilación.....	27
<b>4. Osteocondromatosis múltiple hereditaria (EXT1/EXT2-CDG)</b> .....	<b>27</b>
4.1 Manifestaciones clínicas de EXT1/EXT2-CDG.....	27
4.2 Características de los Osteocondromas.....	28
4.3 Osteocondromatosis Múltiple y Solitaria.....	30
4.4 Condrosarcomas.....	31
<b>5. Bases genéticas de la Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria:</b> .....	<b>32</b>
5.1. Genes <i>EXT1</i> y <i>EXT2</i> .....	32
5.2. Genes supresores de tumores.....	34
5.3 Teoría de la Pérdida de Heterocigocidad.....	35
<b>6. Biosíntesis de proteoglicanos de heparán sulfato</b> .....	¡Error! Marcador no definido.36
<b>7. Placa de crecimiento epifisiaria y etapas de crecimiento del hueso endocondral</b> .....	<b>39</b>
<b>8. Mecanismos de señalización de HSPG en la placa de crecimiento epifisiaria</b>	<b>41</b>
<b>9. Hipótesis de formación de los osteocondromas</b> .....	<b>43</b>
<b>10. Hipótesis de la progresión desde osteocondromas a condrosarcomas</b> .....	<b>46</b>
<b>11. Diagnóstico clínico y molecular de Osteocondromatosis</b> .....	¡Error! Marcador no definido.48
<b>12. Afectación de tejidos no esqueléticos</b> .....	<b>49</b>
<b>13. Tratamiento</b> .....	<b>50</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	¡Error! Marcador no definido.52
<b>OBJETIVOS</b> .....	¡Error! Marcador no definido.53

OBJETIVO GENERAL.....	¡Error! Marcador no definido.54
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
PARTE A.....	54
PARTE B.....	¡Error! Marcador no definido.54
MATERIALES Y MÉTODOS .....	55
MATERIALES.....	56
1. Población de estudio e individuos controles .....	¡Error! Marcador no definido.56
2. Criterios de inclusión .....	56
3. Criterios de exclusión .....	¡Error! Marcador no definido.56
4. Muestras biológicas .....	57
3.1 Preparación de ADN genómico humano .....	¡Error! Marcador no definido.57
3.2 Subfraccionamiento celular de tejido de cartilago afectado por ostecondromas .....	57
3.3 Medición de proteínas.....	58
METODOLOGÍA.....	60
PARTE A.....	60
4. Análisis de variables clínico-radiológicas.....	60
5. Estudios moleculares .....	¡Error! Marcador no definido.62
5.1 Búsqueda de mutaciones puntuales en los genes EXT1 y EXT2.....	¡Error! Marcador no definido.63
5.2 Análisis In silico de mutaciones sin sentido o missense.....	64
5.2.1 Herramientas bioinformaticas utilizadas en el análisis In silico.....	65
5.2.2 Análisis enzimático de restricción .....	66
5.3 Análisis In silico de mutaciones intrónicas .....	66
5.4 Estudio de grandes deleciones o rearrreglos medianos en genes EXT1 y EXT2 .....	67
5.5 Estudio de Pérdida de Heterocigocidad (LOH) .....	¡Error! Marcador no definido.68
PARTE B.....	68
6. Estudio de expresión de las proteínas exostosina 1 y exostosina 2 .....	68
6.1 Separación de proteínas por SDS-PAGE y detección por Western blot.....	68
7. Cuantificación de niveles de expresión de ambas proteínas .....	69
8. Análisis estadístico.....	69
RESULTADOS .....	70
PARTE A .....	¡Error! Marcador no definido.71
1. Análisis y registro en base de datos de las variables clínico-radiológicas estudiadas .....	71
1.1 Ingreso de pacientes al estudio .....	71

1.2 Estudio de variables clínico-radiológicas para la determinación del fenotipo clínico .....	71
1.2.1 Localización de lesiones en pacientes con osteocondromatosis múltiple .....	¡Error! Marcador no definido.72
1.2.2 Localización de lesiones en pacientes con osteocondromatosis solitaria ....	73
1.2.3 Determinación del grado de severidad del fenotipo en pacientes con osteocondromatosis múltiple.....	74
1.2.4 Fenotipo clínico en pacientes con transformación maligna a condrosarcoma .....	75
<b>2. Búsqueda de mutaciones en los genes EXT1 y EXT2.....</b>	<b>79</b>
2.1 Análisis mediante amplificación por PCR y secuenciación directa.....	79
2.2 Ensayos de amplificación con sondas MLPA (multiplex ligation dependent probe amplification) .....	80
2.3 Validación de mutaciones missense por análisis de restricción .....	82
2.3.1. Mutación p.Arg346Thr.....	82
2.3.2. Mutación p.Leu264Pro .....	84
2.4 Análisis in silico de mutaciones missense.....	85
2.4.1 Análisis in silico de p.Arg346Thr.....	85
2.4.2 Análisis in silico de p.Leu264Pro.....	88
2.5 Análisis de mutaciones intrónicas.....	¡Error! Marcador no definido.92
<b>3. Base de Datos internacional “Multiple Osteochondromatosis database”93</b>	
<b>4. Análisis de pérdida de heterocigocidad (LOH) específica de tejido.....</b>	<b>96</b>
4.1 En osteocondromas.....	96
4.2 En condrosarcoma .....	96
<b>PARTE B .....</b>	<b>97</b>
<b>5. Expresión de las proteínas exostosina 1 y exostosina 2 en osteocondromas y condrosarcoma humanos .....</b>	<b>97</b>
<b>6.Análisis de asociación de variables fenotípicas en relación con el genotipo en pacientes con EXT1/EXT2-CDG .....</b>	<b>99</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>110</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>127</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>130</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>142</b>
 <b>INDICE DE FIGURAS</b>	
Figura 1: Representación esquemática de la unión de glicanos a proteínas. ....	16
Figura 2: Representación esquemática de la estructura química del heparán sulfato..	20

Figura 3: Representación esquemática de la estructura de un proteoglicano.....	20
Figura 4: Imágenes radiológicas de diferentes tipos de osteocondromas.....	29
Figura 5: Imágenes fotográficas de las manifestaciones clínicas y radiológicas en OM.....	30
Figura 6: Imagen de la estructura génica de <i>EXT1</i> y <i>EXT2</i> y de la estructura terciaria de las proteínas exostosina 1 y 2 .....	34
Figura 7: Modelo hipotético de formación de un osteocondroma.....	36
Figura 8: Representación esquemática de las etapas de biosíntesis de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG).....	38
Figura 9: Diferenciación de condrocitos en la placa de crecimiento endocondral según las diferentes etapas del desarrollo.....	41
Figura 10: Representación del complejo <i>EXT1/EXT2</i> en la síntesis de HSPG. ....	44
Figura 11: Esquema hipotético de la malignización de un osteocondroma a condrosarcoma secundario periférico.....	48
Figura 12: Protocolo de centrifugación diferencial para la separación de las fracciones subcelulares de cartílago normal y de osteocondromas.....	59
Figura 13: Algoritmo implementado para el estudio clínico y molecular de pacientes con osteocondromatosis .....	60
Figura 14: Imágenes de fotografías y rayos X de lesiones en pacientes OM.....	72
Figura 15: Localización de osteocondromas en pacientes OM.....	73
Figura 16: Osteocondromas en pacientes con OS.....	74
Figura 17: Gráfico que indica el fenotipo clínico y el grado de severidad en OM.....	75
Figura 18: Imágenes radiológicas obtenidas de un osteocondroma de pelvis malignizado.....	76
Figura 19: Imágenes de microscopía óptica de tejido extraído de condrosarcoma.....	77
Figura 20: Diagrama del pedigrí de la familia de P06.....	78
Figura 21: Diagrama del pedigrí del paciente P38.....	78
Figura 22: Frecuencias absolutas y relativas de las mutaciones en los genes <i>EXT1</i> y <i>EXT2</i> en OM. ....	79
Figura 23: Frecuencia absoluta y relativa del tipo de mutaciones puntuales en OM....	80
Figura 24: Perfiles de MLPA con grandes deleciones en <i>EXT1</i> o <i>EXT2</i> .....	81
Figura 25: Imágenes del pedigrí y de la secuencia mutada en P08.....	83
Figura 26: Imagen de digestiones con la enzima de restricción <i>Hpy188I</i> . ....	83
Figura 27: Imágenes del pedigrí y de la secuencia mutada en P17.....	84
Figura 28: Imagen de digestiones con la enzima de restricción <i>BsrFI</i> .....	85

Figura 29: Análisis bioinformático de predicción de patogenicidad de la mutación <i>missense</i> p.Arg346Thr .....	86
Figura 30: Análisis computacional <i>ESE Finder 3.0</i> de la mutación Arg346Thr para evaluar sitios de <i>splicing</i> exónicos del gen <i>EXT1</i> .....	87
Figura 31: Imagen del análisis de la estructura de modelamiento 3-D de la proteína <i>EXT1</i> generado por <i>Phyre2</i> de la mutación p.Arg346Thr .....	88
Figura 32: Análisis bioinformático de predicción de la patogenicidad de la mutación <i>missense</i> p.Leu264Pro .....	89
Figura 33: Análisis computacional con el programa <i>ESE Finder 3.0</i> de la mutación p.Leu264Pro para evaluar sitios de <i>splicing</i> exónicos del gen <i>EXT1</i> .....	90
Figura 34: Análisis de la estructura de modelamiento 3-D de la proteína <i>EXT1</i> generado por <i>Phyre2</i> de la mutación p.Leu264Pro .....	91
Figura 35: Análisis <i>In silico</i> generado por <i>Human Splicing Finder</i> de la mutación intrónica c.1164+1G>A .....	92
Figura 36: Análisis <i>In silico</i> generado por <i>NetGene2</i> de la mutación intrónica c.1164+1 G>A .....	93
Figura 37: Detección en cartílago normal de las proteínas <i>EXT1</i> y <i>EXT2</i> .....	98
Figura 38: Detección en osteocondromas de las proteínas <i>EXT1</i> y <i>EXT2</i> .....	99
Figura 39: Localización de osteocondromas en los 3 grupos de pacientes con OM. .	100
Figura 40: Análisis de asociación según el sexo en los 3 grupos de pacientes con OM .....	101
Figura 41: Análisis de asociación entre edad de inicio y tiempo de evolución de la enfermedad en los 3 grupos de pacientes con OM .....	102
Figura 42: Análisis de asociación entre tipo de osteocondromas en los 3 grupos de pacientes con OM. ....	103

### **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Clasificación y nomenclatura de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG): Defectos producidos en las vías de N-Glicosilación. ....	24
Tabla 2: Clasificación y nomenclatura de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG): Defectos producidos en las vías de la O-Glicosilación .....	25
Tabla 3: Clasificación y nomenclatura de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG): Defectos en la síntesis de glicoesfingolípidos, anclajes de glicosilfosfatidilinositol y en múltiples vías .....	26
Tabla 4: Variables clínicas para determinar la tasa funcional en OM .....	61

Tabla 5: Variables clínicas para determinar la severidad del fenotipo en OM.....	61
Tabla 6: Determinación de subtipos de severidad en OM .....	62
Tabla 7: Cebadores utilizados para amplificar y secuenciar los genes <i>EXT1</i> y <i>EXT2</i> ..	64
Tabla 8: Mutaciones encontradas en los genes <i>EXT1</i> o <i>EXT2</i> .....	82
Tabla 9: Análisis de variables clínicas y moleculares de pacientes estudiados .....	95
Tabla 10: Análisis de asociación entre diferentes variables clínicas con respecto a los 3 grupos de pacientes con OM .....	104
Tabla 11: Análisis de asociación según el tipo de herencia con respecto a los 3 grupos de pacientes con OM .....	105
Tabla 12: Análisis de asociación entre los genes afectados y la clasificación fenotípica con respecto a los 3 grupos de pacientes con OM .....	106
Tabla 13: Análisis de asociación entre tipo de mutaciones y clasificación fenotípica en los pacientes OM .....	107
Tabla 14: Niveles de expresión de proteínas EXTs en pacientes con OM y OS .....	109

## RESUMEN

La Osteocondromatosis Múltiple (OM) o EXT1/EXT2-CDG, es una patología de herencia autosómica dominante, debida a defectos en la formación de O-glicoconjugados. Afecta a 1/18.000 personas a nivel mundial y está caracterizada por la formación de tumores benignos cartilagosos (osteocondromas) preferentemente en las metáfisis de los huesos largos o en la superficie de los huesos planos. La osteocondromatosis puede presentar lesiones múltiples (OM) con herencia familiar o lesiones solitarias (OS), no hereditarias. La complicación más severa es la transformación maligna de osteocondroma a condrosarcoma secundario (1–3% de pacientes). Los genes *EXT1* (8q24) y *EXT2* (11p12-p13) son genes supresores de tumores que codifican glicosiltransferasas involucradas en la polimerización del heparán sulfato (HS), el cual interviene en el mecanismo de señalización en la placa de crecimiento del hueso endocondral. Alteraciones en la biosíntesis del HS en células de la placa de crecimiento endocondral conducirían a la formación de osteocondromas. Ha sido descrita pérdida de heterocigocidad (LOH) en ambos *loci* de genes *EXT1* y *EXT2* en osteocondromas y condrosarcomas secundarios lo que sugiere que podrían seguir el modelo de “2-hits” clásico de los genes supresores de tumores. Durante esta tesis, se analizaron variables clínicas y se realizó el estudio molecular, en 33 pacientes latinoamericanos. El 82% presentaron OM (n=27) y 18% OS (n=6). El 81% de pacientes OM presentaron fenotipo severo (n=17) distribuidos en los siguientes subgrupos: (IS) (12%, n=2); (IIS) (53%, n=9); (IIIS) (12%, n=2) y (IVS) (23%, n=4). Dos pacientes presentaron transformación maligna a condrosarcoma. Se realizó amplificación por PCR y secuenciación directa de los genes *EXT1* y *EXT2* y el ensayo *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA) para ambos genes. Se identificaron mutaciones en 74% (n=20) de los pacientes OM, 84% (n=16) detectadas por PCR y 16% (n=3) mediante MLPA. Se detectaron 14 mutaciones en *EXT1* (52%), 6 en *EXT2* (18%) y en 7 pacientes OM (26%) no se encontraron mutaciones en estos genes. No se detectó LOH en los genes *EXT1* y *EXT2* en ADN extraído de osteocondromas ni de condrosarcoma. Se detectó la expresión de las proteínas *EXT1* y *EXT2* en tejido de osteocondromas y condrosarcoma de pacientes OM con diferentes grados de severidad fenotípica. Se observó la expresión disminuida o nula de ambas proteínas en los tejidos estudiados, independientemente del gen afectado, del tipo de osteocondromatosis y de la malignización. El análisis estadístico mediante la asociación de diferentes variables con respecto a 3 grupos de pacientes OM: (A) mutaciones en *EXT1* (n=14), (B) mutaciones en *EXT2* (n=6), y (C) sin mutaciones detectadas (n=7) evidenció diferencias significativas en la asociación de estos 3 grupos de pacientes con respecto a las lesiones en miembros inferiores ( $p=0,0417$ ), fémur ( $p=0,0251$ ) y escápula ( $p=0,0396$ ), especialmente en los pacientes del grupo (A). Futuros estudios son necesarios para profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de esta patología en pacientes sin mutaciones detectadas en estos genes. Esto podría deberse a mutaciones en nuevos genes relacionados a esta patología o en regiones de los *loci* *EXT1/EXT2* no analizadas. Probablemente la metodología de secuenciación exómica provea las herramientas necesarias para su identificación.

Este trabajo de tesis ha contribuido a comenzar el estudio de esta enfermedad metabólica hereditaria por primera vez en nuestro país, reconocida dentro del grupo de los Desórdenes Congénitos de Glicosilación (CDG) como EXT1/EXT2-CDG. En conjunto, este estudio multidisciplinario permitió el análisis clínico y genético de un cohorte de 33 pacientes y contribuyó a la profundización en el conocimiento de los mecanismos genéticos involucrados en la fisiopatogénesis de EXT1/EXT2-CDG.



**ABSTRACT**

Multiple Osteochondromatosis (MO), EXT1/EXT2-CDG, is an autosomal dominant disorder produced by defects in the formation of O-glycoconjugates. MO affects 1 in 18.000 among the general population and is characterized by benign cartilage-capped tumors (osteochondromas) located mainly in metaphysis of long bones or the surface of flat bones. Osteochondromatosis is characterized by multiple tumors with a familiar inheritance (MO) or by sporadic solitary osteochondroma (SO), a non-hereditary condition. The most severe complication is malignant transformation to secondary chondrosarcoma (1-3% of patients). *EXT1* (MIM 608177) (8q24) and *EXT2* (MIM 608210) (11p11-p13) are tumor suppressor genes that encode glycosyltransferases involved in heparan sulphate (HS) chain polymerization. HS is involved in signaling mechanisms in the growth plate of endochondral bone. Alterations in HS chains biosynthesis in endochondral growth plate cells lead to osteochondroma formation. Loss of heterozygosity (LOH) was described in *EXT1* and *EXT2* genes in osteochondromas and secondary chondrosarcomas. This fact suggests that *EXT* acts according to the classical two-hit model for tumor-suppressor genes. Here, we report, clinical variables analysis and molecular studies in 33 Latin American patients, 82% of patients presented MO (n=27) and 18% SO (n=6). Eighty one percent of MO patients showed a severe phenotype (n=17), distributed in the different subgroups: (IS) (12%, n=2); (IIS) (53%, n=9); (IIIS) (12%, n=2) and (IVS) (23%, n=4). Two patients presented malignant transformation to chondrosarcoma. *EXT1* and *EXT2* genes have been analyzed by PCR and direct sequencing and by Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA). We found the mutant allele in 74% (n=20) of MO patients, 84% of mutations (n=16) were detected by PCR and direct sequencing and 16% (n=3) by MLPA. Fourteen mutations (52%) were detected in *EXT1*, and 6 (18%) in *EXT2*. Mutations remained unknown in 26% of MO patients (n=7). No LOH were detected neither *EXT1* nor *EXT2* genes of osteochondromas and chondrosarcoma DNA. We detected *EXT1* and *EXT2* proteins expression in osteochondromas and chondrosarcoma tissues in patients with different phenotype severity. Reduced or null *EXT1* and *EXT2* protein levels were observed in these tissues, independently of the affected gene, osteochondromatosis type or malignant transformation. Statistical analyses were performed to associate different clinical variables regarding 3 groups of MO patients: (A) mutations in *EXT1* (n=14), (B) mutations in *EXT2* (n=6) and (C) without mutations in both genes (n=7). The association between the 3 groups of patients detected significant differences related to a higher prevalence of: lower limb (p=0,0417), femur (p=0,0251) and scapula (p=0,0396) localization of lesions, especially in patients from group (A). Additional studies will be necessary to contribute in knowledge of the molecular bases causing this disease, especially in patients without detected mutations in both genes. It suggests to the existence of mutations in different genes related with this disease or in non-analyzed *EXT1/EXT2 loci* regions. Probably exome sequencing analysis will provide the tools for the identification of the causes of this disease. This work has contributed to the study of this metabolic disease for the first time in our country, recently recognized into Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) as EXT1/EXT2-CDG. Altogether, the development of this multi-disciplinary study allowed clinical and genetic analyses of a cohort of 33 patients and contributed to increase knowledge of genetic mechanisms involved in pathophysiology of EXT1/EXT2-CDG.

## ABREVIATURAS

(-/-): Ambos alelos inactivados

(+/-): un alelo inactivado y el otro *wild-type*

11p: brazo largo del cromosoma 11

19p: brazo largo del cromosoma 19

8q: Brazo corto del cromosoma 8

aa: Aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNg: ADN genómico

Arg: Arginina

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Asn: Asparragina

BMP: Proteína morfogenética de hueso

CAM: Cellular Adhesion Molecules (Moléculas de Adhesión Celular)

CDG: Congenital Disorders of Glycosylation (Desórdenes Congénitos de la Glicosilación)

*CDKN2A/p16*: Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina

cDNA: ADN copia

CIES: Comité Interinstitucional de Ética de la Investigación de la Salud

COX2: Ciclooxigenasa 2

CS: Condroitín sulfato

DHPLC: Cromatografía líquida desnaturalizante de alta performance

dNTP: Dinucleótido trifosfato

Dpp: Decapentaplegico

DTT: Ditioneitol

ECL: *Enhanced chemiluminescence*

EMH: Exostosis Múltiple Hereditaria

ESE: *Enhancers de splicing exónicos*(Colaboradores exónicos del corte y empalme)

*EXT1*: Gen *EXT1*

*EXT1*: Proteína exostosina 1,  $\beta$ 1,4-glucuroniltransferasa

*EXT2*: Gen *EXT2*

*EXT2*: Proteína exostosina 2,  $\alpha$ 1,4-Nacetilglucosaminiltransferasa

*EXTL1*, *EXTL2*, *EXTL3*: genes de la familia *EXT-Like*

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

Fzd: Genes *frizzled*

GAGs: Glicosaminoglicanos  
Gal: Galactosa  
Gal: Galactosa  
GalNAc: N-acetilgalactosamina  
GalT-1 y GalT-2: Galactosiltransferasa 1 y 2  
GenBank: Base de datos de secuencias de nucleótidos  
GlcA: Ácido glucurónico  
GlcAT: Glucuroniltransferasa  
GlcNAc: N.acetilglucosamina  
GlcNAc-TI:  $\alpha$ 1,4-N-acetil-hexosaminiltransferasa I  
GlcUA: Ácido urónico  
GPI: glicosilfosfatidilinositol  
H/E: Hematoxilina/Eosina  
HGVS: *Human Genome Variation Society*(Sociedad de las Variaciones del Genoma Humano)  
Hh: *Hedgehog*  
hLys: Hidroxilisina  
hnRNP: Ribonucleoproteína  
HS: Heparán sulfato  
HSPG: Proteoglicanos de heparán sulfato  
Ihh: *Indian hedgehog*(Erizos de India)  
Indel: inserciones y deleciones  
Kb: Kilobases  
KDa: Kilodaltons  
Leu: Leucina  
LLO: Oligosacáridos unidos al dolicol  
LOH: Pérdida de Heterocigocidad  
LOVD: *Leiden Open Variation Database* (Base de datos abierta de Leiden)  
M: Fenotipo moderado  
MIM: Mendelian Inheritance in Men (Herencia Mendeliana en Humanos)  
MLPA: *Multiplex ligation dependent probe amplification*(Amplificación múltiple dependiente de sondas)  
MOdb: *Multiple Osteochondromatosis database*(Base de datos de Osteocondromatosis Múltiple)  
NCBI: *The National Center for Biotechnology Information*  
NDST: N-deacetilasa/N-sulfotransferasa

NIH: National Institute of Health  
O-Fuc: O-fucosil glicanos  
O-Glc: O-glucosil glicanos  
O-GlcNAc: O-N-acetilglucosaminoglicanos  
OM: Osteocondromas múltiples  
OM: Osteocondromatosis Múltiple  
O-Man: O-manosil glicanos  
OS: Osteocondroma solitario  
OST: Oligosacaridil transferasa  
O-Xyl: O-xilosil glicanos  
*p53*: gen que codifica un factor de transcripción nuclear  
Pb: Pares de bases  
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa  
PG: Proteoglicanos  
PHYRE: *Protein Homology Fold Recognition Engine*(Motor de reconocimiento de la homología de las proteínas)  
PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride*, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
Polyphen: *Polymorphism Phenotyping*(Fenotipificación de polimorfismos)  
Pro: Prolina  
PTHrH: Proteína relacionada a la hormona paratiroidea  
PVDF: Polyvinylidene Difluoride (Difluoruro de polivinilo)  
RB1: gen relacionado al retinoblastoma  
RER: Retículo endoplasmático rugoso  
RIPA: *Radio immuno precipitation assay*  
RMN: Resonancia magnética nuclear  
rpm: Revoluciones por minuto  
S: Fenotipo severo  
SDC:sindecanos  
SDS: Dodecil Sulfato de Sodio  
SDS-PAGE: Dodecil Sulfato de Sodio Geles en poliacrilamida  
SELEX: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*(Evolución de ligandos sistemática por enriquecimiento exponencial)  
Ser: Serina  
SF: Factor de *splicing*(Factor de corte y empalme de exones)  
Shh: *Sonic hedgehog*(Erizo Sónico)  
SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*(Polimorfismos de nucleótidos simples)

Ta: Temperatura de *annealing* (Temperatura de templado)

TAC: Tomografía axial computada

TGF: Factor de Crecimiento Transformante

Thr: Treonina

TP53: Fosfoproteína nuclear codificada por el gen *p53*

TPRS: Síndrome tricornofalangeal

Tris: Hidroximetil aminometano

UTR: *untranslated region* (región no traducida)

Wg: *Wingless*

WNTs: Proteínas *Wingless*

wt/wt: Ambos alelos *wild-type* (ambos alelos tipo salvaje)

wt: *wild-type* (Tipo salvaje)

Xyl: Xilosa

XYLT1 y XYLT2: Xilosiltransferasas 1 y 2

# ***INTRODUCCIÓN***



## **INTRODUCCION GENERAL**

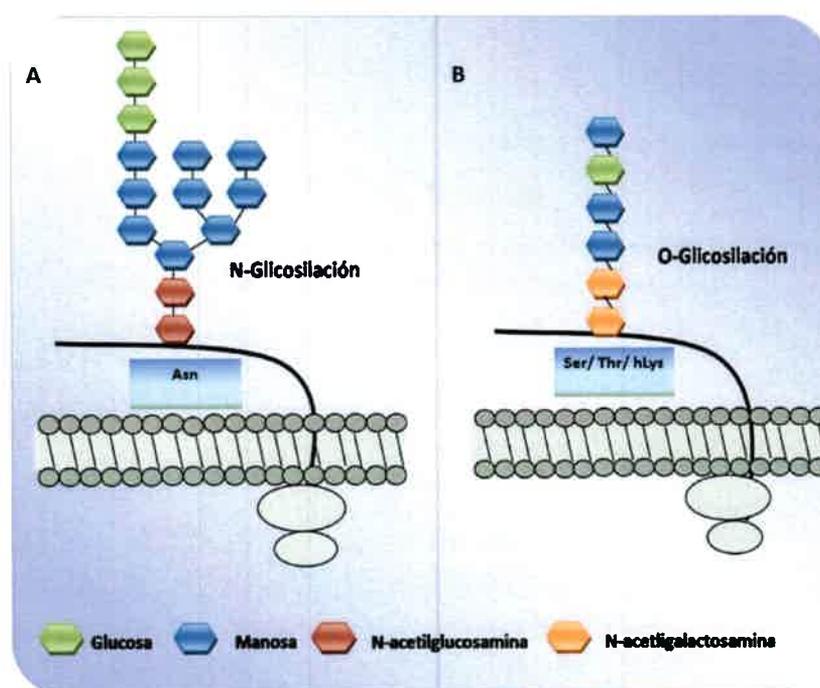
La Osteocondromatosis Múltiple (OM), (MIM# 133700, 133701), conocida también como Exostosis Múltiple Hereditaria (EMH), es una patología ósea de herencia autosómica dominante, que ocurre con una incidencia mundial de 1/18.000 personas (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Stieber & Dormans, 2005). Se caracteriza por la formación de tumores benignos cartilaginosos, denominados osteocondromas, que se desarrollan preferentemente en las metáfisis o huesos endocondrales adyacentes a la placa de crecimiento. Los osteocondromas pueden presentarse como lesiones esporádicas solitarias (OS), no hereditarias o lesiones múltiples con herencia familiar (OM) (Bové, 2008) La complicación más severa que puede presentarse en esta patología es la transformación maligna de un osteocondroma a condrosarcoma, la cual ha sido descrita en <1% de pacientes con osteocondromas solitarios y en 1–3 % de pacientes con osteocondromatosis múltiple (De Andrea & Hogendoorn, 2012).

Actualmente la OM está incluida dentro de un grupo de patologías debidas a alteraciones genéticas en la biosíntesis de glicoconjugados que son denominadas Desórdenes Congénitos de la Glicosilación o *Congenital Disorders of Glycosylation*, cuya sigla en inglés es CDG. Este conjunto de enfermedades, desde su reconocimiento por el Prof. Dr. J. Jaeken en 1980, han puesto de manifiesto la importancia crucial de la glicobiología en las enfermedades humanas. Estas patologías ocasionadas por alteraciones en la biosíntesis de los glicanos, en su unión a otros compuestos y/o en el procesamiento posterior de los N- u O-glicoconjugados, forman un grupo cada vez más numeroso (Artuch et al., 2003; Briones et al., 2002; Jaeken, 2003; Marklová & Albahri, 2007; Wopereis et al., 2003; Wopereis, et al., 2006).

### **1. Formación de Glicoconjugados**

La glicosilación se caracteriza por la unión covalente de glicanos (monosacáridos o polisacáridos) en secuencias consenso de proteínas y lípidos, que dan origen a un amplio repertorio de glicoconjugados, altamente conservados desde archa y eubacterias hasta eucariotas superiores. En seres humanos, la unión de carbohidratos al esqueleto peptídico comprende predominantemente los enlaces N- y O-glicosídicos, que pueden coexistir en una misma proteína. Los N-glicanos están unidos al grupo amino de residuos asparagina (Asn), mientras que los O-glicanos al grupo oxidrilo de residuos serina (Ser), treonina (Thr) o hidroxilisina (hLys) mediante una N-acetilgalactosamina,

manosa, xilosa, fucosa u otros monosacáridos (Figura 1 A y B). A diferencia de los N-glicanos que son de estructura ramificada, los proteoglicanos que también están unidos a residuos serina y/o treonina, son lineales y sintetizados por diferentes vías, siendo compuestos altamente sulfatados. La glicosilación de lípidos es también muy frecuente, comprende a glicoesfingolípidos (gangliósidos con alto contenido de ácido siálico) y a los anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (glicolípidos de membrana unidos a distintos tipos de proteínas mediante una estructura núcleo común) (Varki, 1993).



**Figura 1: Representación esquemática de la unión de glicanos a proteínas.** (A) Los N-glicanos están unidos a residuos asparagina (Asn) de la proteína naciente mediante una N-acetilglucosamina. (B) Los O-glicanos están unidos a residuos serina (Ser), treonina (Thr) o hidroxilisina (hLys) mediante una N-acetilgalactosamina, manosa, xilosa, fucosa u otros monosacáridos.

### 1.1 N-Glicosilación

El proceso de N-glicosilación comprende la síntesis de un oligosacárido que será unido al grupo amina del residuo Asn de la proteína naciente. Este proceso, se inicia en el citoplasma, continúa en el retículo endoplasmático rugoso (RER) con la posterior modificación de la glicoproteína en el aparato de Golgi. La síntesis del oligosacárido comprende la unión secuencial en el citoplasma de azúcares cedidos por azúcares nucleótidos activados (GDP-GlcNAc, GDP-Man, GDP-Glc) catalizada por diferentes enzimas glicosiltransferasas que posteriormente sintetizan la cadena de oligosacáridos unidos al dolicol (LLO) en la membrana citosólica del RER (Figura 1). La translocación de

un oligosacárido intermediario ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ ) hacia el lumen del RE, permite que esta estructura continúe su formación hasta completar un núcleo o core ( $\text{Glc3Man9GlcNAc}_2$ ) que luego será transferido a través de una N-acetilglucosamina al residuo Asn de la proteína naciente. En este proceso, interviene un complejo enzimático denominado oligosacaridil transferasa (OST). La unión de la porción glicano a la proteína se realiza mediante una N-acetilglucosamina en una secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Posteriormente, aún en el RE, se eliminan 3 moléculas de Glc y 1 de Man, resultando en una estructura "rica en manosa" (Helenius et al., 2002, Hennes, 2012). La proteína glicosilada es transferida al aparato de Golgi, donde será modificada por medio de diferentes enzimas con función de glicosidasas y glicosiltransferasas que remueven residuos manosa y adicionan diversos monosacáridos tales como, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal), ácido siálico, fucosa, y N-acetilgalactosamina (GalNAc), produciendo así una amplia variedad de estructuras de N-glicanos de diferente complejidad (Helenius & Aebi, 2004; Hennes, 2012; Jaeken, 2010).

### 1.2 O-Glicosilación

El proceso de O-glicosilación es un proceso que ocurre principalmente en el aparato de Golgi y a diferencia de las N-glicoproteínas, que presentan una ruta de biosíntesis común y solamente difieren en los procesos de modificación que ocurren en el aparato de Golgi, la síntesis de los O-glicanos se produce posteriormente a la oligomerización y plegamiento de la proteína por medio de O-glicosiltransferasas. Estas enzimas, están ubicadas en el aparato de Golgi, participan ensamblando secuencialmente cadenas de glicanos y formando un núcleo de oligosacáridos que será unido a oxhidrilos de residuos serina (Ser), treonina (Thr) ó hidroxilisina (hLys) de la proteína posteriormente a su síntesis y plegamiento (Hameetman et al., 2007). La síntesis del oligosacárido, su transferencia a la cadena polipeptídica naciente y su modificación subsecuente requiere de numerosas etapas. La composición de las cadenas de O-glicanos presenta mayor diversidad que la de los N-glicanos. Cada monosacárido posee 3 ó 4 sitios de anclaje a otros azúcares y además tiene la posibilidad de producir uniones alfa o beta glucosídicas. De este modo, la O-glicosilación da lugar a la síntesis de 7 clases diferentes de O-glicanos; que son clasificados de acuerdo al primer azúcar unido al grupo hidroxilo de una proteína y comprenden: **O-N-acetilglucosaminoglicanos** cuando el azúcar es N-acetilglucosamina (O-GlcNAc); **glicanos tipo mucinas** cuando el azúcar es N-acetilgalactosamina (O-GalNAc), **O-galactosil glicanos** cuando el azúcar es galactosa

(O-Gal), **O-xilosil glicanos** cuando el azúcar es xilosa (O-Xyl) constituidos por los glicosaminoglicanos (GAGs), **O-manosil glicanos** cuando el azúcar es manosa (O-Man), **O-glucosil glicanos** cuando el azúcar es glucosa (O-Glc) y **O-fucosil glicanos** cuando el azúcar es fucosa (O-Fuc). Los O-glicanos más abundantes en seres humanos están constituidos por glicano tipo mucinas unidos mediante O-GalNAc (Martinez-Duncker et al., 2012; Jaeken et al., 2009; Wopereis et al., 2006).

## **2. Importancia de los Glicoconjugados**

Se estima que el 1% de los genes en el ser humano están implicados en los procesos de glicosilación y más de la mitad de las proteínas de nuestro cuerpo están glicosiladas. Los glicanos intervienen en numerosos procesos indispensables para el normal funcionamiento de los sistemas biológicos. Entre ellos, participan en el correcto plegamiento y estabilidad de las proteínas, en los mecanismos de control de calidad de glicoproteínas, en procesos de activación enzimática, intervienen en la respuesta inmune, juegan un papel importante en el tráfico intracelular e intercelular, "marcando" proteínas que serán transportadas a diferentes estructuras celulares, como el rol de la manosa-6-fosfato en el destino de las enzimas que se dirigen a los lisosomas (Varki, 1993; Wopereis et al., 2006). Su importancia reside principalmente en el carácter multisistémico de su participación en el metabolismo humano. Los glicanos cumplen un rol esencial en el reconocimiento, adhesión y migración celular, participando en las etapas del desarrollo y en mecanismos de defensa y antigenicidad (Jaeken, 2011; Wopereis et al., 2006).

Entre las principales funciones que cumplen los O-glicanos se reconoce su intervención en los mecanismos de estabilidad, estructura, inmunidad, señalización celular mediada por receptores, interacciones proteicas inespecíficas, modulación en la actividad enzimática, expresión y procesamiento de las proteínas, etc. El rol biológico de estos compuestos es crucial para el desarrollo, crecimiento, función y supervivencia de los organismos. Los O-glicanos pueden influir además en la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas al igual que en la agregación proteica. Intervienen en el mantenimiento de la estabilidad de las proteínas, la resistencia al calor, hidrofobicidad y la resistencia a la degradación por proteasas. Otra función importante de los O-glicanos es la de intervenir como mediadores para el reconocimiento entre proteínas, direccionando proteínas no enzimáticas como las lectinas. Además, los O-glicanos participan en el crecimiento celular, la apoptosis, procesos de endocitosis, interacciones entre células y

con la matriz extracelular. Los O-glicanos también participan en el ensamblaje de la matriz extracelular y en la fertilización del oocito (Varki, 1993; Wopereis et al., 2006).

Entre las clases de glicanos mencionados anteriormente, los GAGs se unen a las proteínas formando los proteoglicanos (PG), que se encuentran ampliamente distribuidos en la matriz extracelular. Los GAGs poseen grupos sulfato que le otorgan a la molécula carga negativa mediante la cual establecen interacciones con moléculas de agua, proporcionando de este modo resistencia a la compresión, lubricación y reducción en la fricción en tejidos estructurales como el cartílago que se encuentra en las articulaciones y participan como molde para la formación del hueso endocondral. Es importante destacar que los GAGs cumplen además un rol en interacciones inespecíficas de las proteínas, por ej. los PG de la superficie celular se adhieren a factores de crecimiento, regulando así la difusión y el gradiente de concentración de los mismos (Jaeken, 2011; Wopereis et al., 2006).

Debido a que los O-glicanos están involucrados en numerosos procesos celulares, es inevitable que defectos en su biosíntesis produzcan severas anomalías en el funcionamiento de distintos tipos de células resultando en un amplio espectro de signos y síntomas clínicos involucrados en diferentes procesos patológicos (Coman et al., 2008; Spiro & Spiro, 2000; Wopereis et al., 2006).

## **2.1 Glicosaminoglicanos**

De acuerdo a su estructura química los GAGs están formados por la unión polimérica de unidades de disacáridos constituidos por un aminoazúcar unido a un ácido urónico. Según la composición de los azúcares, los GAGs pueden clasificarse en: a) ácido hialurónico, b) condroitín sulfato, c) queratán sulfato, d) dermatán sulfato y e) heparán sulfato. Los GAGs presentan una gran heterogeneidad atribuida a la variabilidad que existe en la síntesis de los mismos (Gallagher & Lyon, 1986). El heparán sulfato (HS) es un GAG lineal formado por unidades alternadas de glucosamina N-acetilada o N-sulfatada y ácido glucurónico ó idurónico. El HS es sintetizado por la mayoría de las células de mamíferos como un componente de los proteoglicanos, con una distribución ubicua en las membranas plasmáticas y en la matriz extracelular en una amplia variedad de tejidos de diferentes especies animales (Figura 2) (Ornitz, 2011).

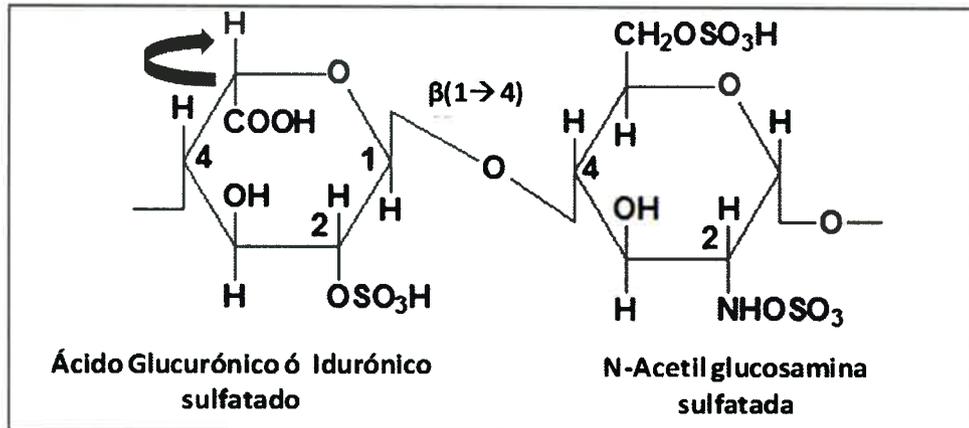


Figura 2: Representación esquemática de la estructura química del heparán sulfato. Formado por la unión glicosídica  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 de un ácido glucurónico o idurónico sulfatado con una N-acetil glucosamina sulfatada.

## 2.2 Proteoglicanos

Los proteoglicanos (PG) son una familia de moléculas complejas, multifuncionales formadas por la unión covalente del oxidrilo de una xilosa de una o más cadenas de GAGs a residuo serina de una proteína, mediante un proceso de O-glicosilación (Figura 3).

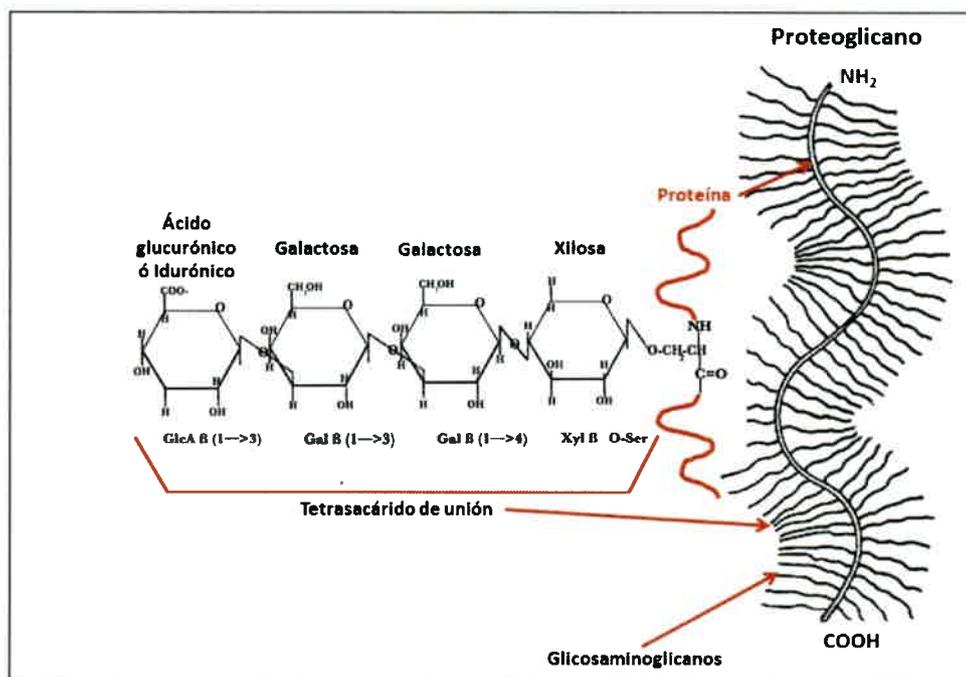


Figura 3: Representación esquemática de la estructura de un proteoglicano. Se destaca la estructura del tetrasacárido de unión de cada cadena unida a un residuo de serina de la proteína.

Los proteoglicanos pueden unirse e interactuar con proteínas, y esas interacciones proteína-GAGs cumplen roles esenciales durante las diferentes etapas del desarrollo,

principalmente en procesos de proliferación y diferenciación celular (Esko & Lindahl, 2001).

### **2.3 Proteoglicanos de heparán sulfato**

Los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) son una familia compleja y heterogénea de macromoléculas compuestas por una cubierta proteica y una o más cadenas de HS (Gallagher & Lyon, 1986). Las cadenas de HS se unen por medio de un residuo de xilosa aloxidrido del aminoácido serina de una proteína (Gallagher & Lyon, 1986; Hardingham et al., 1992).

Los HSPGs se expresan tanto en la superficie celular como en la matriz extracelular, se encuentran estratégicamente posicionados para regular interacciones entre las células y su micro-medioambiente. La actividad biológica de estos compuestos, depende principalmente de la carga negativa de los dominios sulfatados que permite la interacción de las cadenas de HS con proteínas; así como también depende de la distribución de los residuos de HS a lo largo de estas cadenas. Este rasgo estructural se establece durante la biosíntesis del HS, pero puede también sufrir modificaciones por la acción post-biosintética de diferentes endosulfatasas (Gallagher & Lyon, 1986; Nakanaka & Kitagawa, 2008).

Los HSPGs cumplen funciones importantes en el proceso de modulación de la señalización celular a través de interacciones con una amplia variedad de ligandos proteicos como factores de crecimiento, citoquinas, sustancias que favorecen el desarrollo tisular "morfógenos" y proteínas de la matriz extracelular regulando diferentes procesos fisiológicos, como la homeóstasis, el crecimiento celular normal; así como en el desarrollo de funciones involucradas en la diferenciación y migración celular. Además, los HSPGs pueden afectar la distribución de moléculas de señalización en los epitelios y, por lo tanto, participan en la regulación del gradiente de morfógenos y en el metabolismo nutricional durante las etapas del desarrollo (Bishop et al., 2007; Carlsson et al., 2008; Gallagher & Lyon, 1986; Selleck, 2000). Los HSPGs también intervienen en la unión de proteínas adhesivas, en el anclaje de las células a la matriz extracelular y actúan como receptores para la captación hepática de lipoproteínas ricas en triglicéridos (Bishop, Schuksz, & Esko, 2007; Kreuger & Kjellén, 2012; Schrage et al., 2009).

Algunos HSPGs están representados por glicoproteínas y sindecanos, los cuales se encuentran adheridos a la membrana plasmática mediante una unión glicosilfosfatidilinositol (GPI), o unidos a un dominio de transmembrana, respectivamente. Los glicoproteínas son proteínas que presentan un gran dominio globular

rico en residuos de cisteína que contiene 2 a 5 sitios consenso de unión a cadenas de HS y una secuencia señal hidrofóbica en el extremo C-terminal unida un residuo de anclaje GPI que sirve de unión a la membrana plasmática. Los sindecanos son proteínas de membrana tipo I que presentan un dominio extenso extracelular que contiene 2 ó 3 sitios de unión a los GAGs así como sitios de unión a la membrana y dominios citosólicos cortos por medio de los cuales se unen a moléculas efectoras (Kirn-Safran et al., 2004).

Los perlecanos constituyen otro grupo importante de HSPGs y se encuentran distribuidos en las membranas basales de todas las células. Además, son constituyentes de la matriz extracelular de la placa de crecimiento cartilaginosa, con un rol muy importante en el desarrollo normal de la misma. Los perlecanos se encuentran formados por una cubierta proteica que contiene aproximadamente 5 dominios, aunque solamente el dominio I es el sitio de unión a los GAGs en el extremo N-terminal donde se encuentran 2 ó 3 cadenas de HS, y en el extremo C-terminal se unen 1 cadena de condroitín sulfato (CS), aunque la composición y tamaño de los GAGs es variable con respecto al tejido en el que se encuentren (Kirn-Safran et al., 2004). No obstante, las tres familias de HSPGs se encuentran conservadas evolutivamente desde *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans* hasta vertebrados. Diferentes tipos y concentraciones de HS pueden ser expuestos en la superficie celular unidos a sindecanos y glicanos, y/o en la matriz extracelular unidos a los perlecanos y a colágeno tipo VIII (Kreuger & Kjellén, 2012; Schrage et al., 2009).

### **3. Desórdenes Congénitos de la Glicosilación**

Los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG) son un grupo de enfermedades genéticas humanas producidas por defectos en la síntesis de glicanos, en su unión a proteínas ó lípidos, ó en el posterior procesamiento de los glicanos en el aparato de Golgi (Hennet, 2012; Jaeken, 2010). En la actualidad se han caracterizado más de 50 defectos genéticos diferentes, incluidos dentro de la clasificación de CDG. La mayoría están representados por alteraciones en la vía de la N-glicosilación, los cuales pueden ser debidos a mutaciones en genes que codifican para enzimas citosólicas, del RER o de Golgi, como así también para transportadores e incluso alteraciones que afectan a ambas vías metabólicas. Debido a que los azúcares nucleótidos, enzimas y transportadores que participan durante la biosíntesis de los glicanos pueden ser

comunes para ambas vías, se han podido observar patologías debidas a defectos combinados por alteraciones ya sea N-glicosilación como O- glicosilación (Tabla 1).

Las alteraciones de O-glicosilación descritas hasta el momento, sólo involucran enzimas y/o transportadores que participan en la remodelación del glicano en el aparato de Golgi (Tabla 2). Además, han sido incluidas como CDG, enfermedades que presentan defectos en las vías de glicosilación de glicoesfingolípidos y anclajes de glicofosfatidilinositol (Tabla 3) (Artuch et al., 2003; Briones et al., 2002; Cheillan et al., 2004; Jaeken, 2011; Marklová & Albahri, 2007; Wopereis et al., 2007, 2006).

### **3.1 Clasificación de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación**

A partir del año 2010, se implementó una nueva nomenclatura para la designación de los defectos genéticos que producen CDG. Anteriormente se usaban números romanos y letras arábigas en orden alfabético para nombrar y clasificar los defectos de la glicosilación (CDG-Ia, CDG-Ib, etc). Sin embargo, dada su complejidad, la nueva clasificación utiliza el símbolo del gen o de la proteína afectada seguida de "CDG" ([www.genenames.org](http://www.genenames.org)) (Frank et al., 2004; Jaeken et al., 2009; Martinez-Duncker et al., 2005; Wopereis et al., 2007).

Tabla 1: Clasificación y nomenclatura de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG): Defectos producidos en las vías de N-Glicosilación

Nombre de la enfermedad	Nombre previo	Proteína defectuosa	OMIM
PMM2-CDG	(CDG-Ia)	Fosfomanomutasa 2	<a href="#">601785</a>
MPI-CDG	(CDG-Ib)	Fosfomanosa isomerasa	<a href="#">602579</a>
ALG1-CDG	HMT1-CDG (CDG-Ik)	GDP-Man : GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol manosiltransferasa (manosiltransferasa VI)	<a href="#">608540</a>
ALG2-CDG	(CDG-li)	GDP-Man : Man <sub>1</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol manosiltransferasa (manosiltransferasa 2)	<a href="#">607906</a>
ALG3-CDG	NOT56L-CDG (CDG-Id)	Dol-P-Man : Man <sub>5</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol manosiltransferasa(manosiltransferasa 6)	<a href="#">601110</a>
ALG6-CDG	(CDG-Ic)	Dol-P-Glc : Man <sub>9</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol glucosiltransferasa (glucosiltransferasa 1)	<a href="#">603147</a>
ALG8-CDG	(CDG-Ih)	Dol-P-Man : Man <sub>7</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol manosiltransferasa(manosiltransferasaVIII)	<a href="#">608104</a>
ALG9-CDG	DIBD1-CDG (CDG-IL)	Dol-P-Man : Man <sub>6</sub> -and Man <sub>8</sub> -GlcNA <sub>2</sub> -P-P- Dol manosiltransferasa (manosiltransferasa VII-IX)	<a href="#">608776</a>
ALG11-CDG	(CDG-Ip)	manosiltransferasa IV/V	<a href="#">613661</a>
ALG12-CDG	(CDG-Ig)	Dol-P-Man : Man <sub>7</sub> -GlcNAc <sub>2</sub> -P-P-Dol manosiltransferasa (manosiltransferasa 8)	<a href="#">607143</a>
DPAGT1- CDG (ALG7)	(CDG-Ij)	UDP-GlcNAc : Dol-P-GlcNAc-P transferasa (Dolicol fosfato N- acetilglucosamina-1 fosfato transferasa)	<a href="#">608093</a>
GCS1-CDG	GLS1-CDG (CDG-IIb)	Glucosidasa 1	<a href="#">606056</a>
MAGT1-CDG		Subunidad de la oligosacaridiltransferasa	<a href="#">300715</a>
MGAT2-CDG	(CDG-IIa)	N-acetilglucosaminiltransferasa 2	<a href="#">602616</a>
RFT1-CDG	(CDG-In)	Flipasa de Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -PP-Dol	<a href="#">611633</a>
TUSC3-CDG		Subunidad de la oligosacaridiltransferasaTUSC3	<a href="#">601385</a>

Tabla 2: Clasificación y nomenclatura de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG): Defectos producidos en las vías de la O-Glicosilación

Nombre de la enfermedad	Proteína afectada	OMIM
<b>*Síntesis de O-xilosilglicanos</b>		
EXT1/EXT2-CDG (Osteocondromatosis múltiple)	Glucuroniltransferasa/N-acetilglucosaminiltransferasa $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa 7	<a href="#">608177/608210</a>
B4GALT7-CDG	$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa 7	<a href="#">604327</a>
<b>*Síntesis de O-N-acetilgalactosaminilglicanos</b>		
GALNT3-CDG (Calcinosis tumoral familiar)	O-N acetilgalactosaminil-transferasa 3	<a href="#">601756</a>
<b>*Síntesis de O-xilosil/N-acetilgalactosaminilglicanos</b>		
SLC35D1-CDG (Displasia de Schneckenbecken)	Miembro D1 del transportador dual UDP-ácido glucurónico / UDP-N-acetilgalactosamina	<a href="#">610804</a>
<b>*Síntesis de O-manosilglicanos</b>		
POMT1/POMT2-CDG (Distrofia muscular congénita)	O-manosiltransferasa 1	<a href="#">607423</a>
POMGNT1-CDG (Distrofia muscular congénita)	O-manosa $\beta$ -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa	<a href="#">606822</a>
FKTN-CDG (Distrofia muscular congénita de Fukuyama)	Glicosiltransferasa Fukutina	<a href="#">607440</a>
FKRP-CDG (Distrofia muscular congénita)	Proteína relacionada a la Fukutina	<a href="#">606596</a>
LARGE-CDG (Distrofia muscular congénita)	Proteína tipo N-acetilglucosaminiltransferasa	<a href="#">603590</a>
<b>*Síntesis de O-fucosilglicanos</b>		
LFNG-CDG (Disostosis espándilo-costal tipo 3)	O-fucosa específica $\beta$ -1,3-N-acetilglucosamino-transferasa	<a href="#">602576</a>
B3GALTL-CDG (Síndrome de Peters plus)	O-fucosa específica- $\beta$ -1,3-glicosiltransferasa	<a href="#">610308</a>

Tabla 3: Clasificación y nomenclatura de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG): Defectos en la síntesis de glicos esfingolípidos, anclajes de glicosilfosfatidilinositol y en múltiples vías

Nombre de la enfermedad	Nombre previo	Proteína afectada	OMIM
ST3GAL5-CDG (Epilepsia infantil Amish)	SIAT9-CDG	Lactoceramida $\alpha$ -2,3-sialotransferasa (GM3 sintetasa)	<a href="#">609056</a>
PIGM-CDG (Deficiencia en glicosilfosfatidilinositol)		Fosfatidilinositolglicano, clase M	<a href="#">610273</a>
PIGV-CDG (Deficiencia en glicosilfosfatidilinositol)		Fosfatidilinositolglicano, clase V	
DPM1-CDG	(CDG-Ie)	Dolicol-fosfato-manosiltransferasa (DOIP-Man sintasa 1)	<a href="#">603503</a>
MPDU1-CDG	(CDG-If)	Man-P-Dol Utilization 1/Lec 35	<a href="#">608799</a>
B4GALT1-CDG	(CDG-IId)	$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa 1	<a href="#">607091</a>
GNE-CDG (Miopatía con cuerpos de inclusión hereditaria)		UDP-GlcNAc epimerasa/quinasa	<a href="#">600737</a>
SLC35A1-CDG (Deficiencia del transportador de ácido siálico-CMP)	(CDG-IIf)	Transportador CMP de ácido siálico	<a href="#">605634</a>
SLC35C1-CDG (Deficiencia del transportador de GDP-Fucosa)	(CDG-IIc)	Transportador GDP de fucosa	<a href="#">605881</a>
<b>*Defectos en la vía del Dolicol</b>			
DK1-CDG	(CDG-Im)	Dolicol kinasa	<a href="#">610768</a>
SRD5A3-CDG	(CDG-Iq)	5-alfa Reductasa esteroidea tipo 3	<a href="#">612379</a>
<b>*Defectos en COG (Conserved Oligomeric Golgi)</b>			
COG1-CDG	(CDG-IIg)	Complejos oligoméricos de Golgi conservados en la subunidad 1	<a href="#">606973</a>
COG4-CDG	(CDG-IIj)	Complejos oligoméricos de Golgi conservados en la subunidad 4	<a href="#">606976</a>
COG5-CDG		Complejos oligoméricos de Golgi conservados en la subunidad 5	<a href="#">606821</a>
COG7-CDG	(CDG-IIe)	Complejos oligoméricos de Golgi conservados en la subunidad 7	<a href="#">606978</a>
COG8-CDG	(CDG-IIh)	Complejos oligoméricos de Golgi conservados en la subunidad 8	<a href="#">606979</a>
<b>*Defectos en V-ATPasa</b>			
ATP6V0A2-CDG (cutis laxa tipo II)		Subunidad V0 subunit A2 de la H(+)-ATPasa vesicular	<a href="#">611716</a>
<b>*Defectos en COP II</b>			
SEC23B-CDG (CDAll) (Anemia diseritropoyética congénita tipo II)		Componente SEC23B de COPII	<a href="#">610512</a>

### **3.2 Manifestaciones clínicas en patologías debidas a Desórdenes Congénitos de Glicosilación**

La mayoría de las patologías debidas a CDG se transmiten mediante herencia autosómica recesiva, excepto EXT1/EXT2-CDG (ostecondromatosis múltiple hereditaria) que presenta una herencia autosómica dominante y MAGT1-CDG con herencia ligada al cromosoma X. Los pacientes afectados con CDG presentan manifestaciones clínicas muy variables, principalmente multisistémicas y con compromiso neurológico muy severo en las alteraciones de N-glicosilación. Sin embargo, las anormalidades debidas a alteraciones en la glicosilación son muy heterogéneas, principalmente si se corresponden a desórdenes de O-glicosilación, entre las que se encuentran diferentes clases de distrofias musculares, condrodisplasias, mucopolisidosis I y II, trastornos de la migración neuronal, entre otras (Hennet, 2012; Morava et al., 2008; Ohtsubo & Marth, 2006).

## **4. Osteocondromatosis múltiple hereditaria (EXT1/EXT2-CDG)**

De acuerdo a la nomenclatura utilizada para designar los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación, la osteocondromatosis múltiple hereditaria (OM) ha sido denominada como EXT1/EXT2-CDG. Han sido identificadas hasta el momento alteraciones endogénicas en relación a OM, en el gen *EXT1* (MIM 608177), ubicado en el cromosoma 8 (8q24.11-q24.13) y en el gen *EXT2* (MIM 608210) localizado en el cromosoma 11 (11p12-p11). Existiría un posible tercer gen, *EXT3* cuyo locus ha sido localizado en el brazo corto del cromosoma 19 (19p) pero aún no se han detectado alteraciones en este locus en relación a esta patología (Ahn et al., 1995; Busse et al., 2007; Hecht et al., 1995; Lind et al., 1998; Nadanaka & Kitagawa, 2008; Wuyts et al., 1996). Se ha descrito un porcentaje de pacientes con ausencia de mutaciones en ambos genes (*EXT1* y *EXT2*) aproximadamente un 10% (Pedrini et al., 2011) a un 30% (Signori et al., 2007) según los estudios realizados. Se postula que la ausencia de mutaciones en *EXT1* y *EXT2* podría deberse a alteraciones en otros genes que intervienen en la biosíntesis del HS, incluyendo los genes de la familia *EXT-Like* (*EXTL1*, *EXTL2*, *EXTL3*) (Xu et al., 1999).

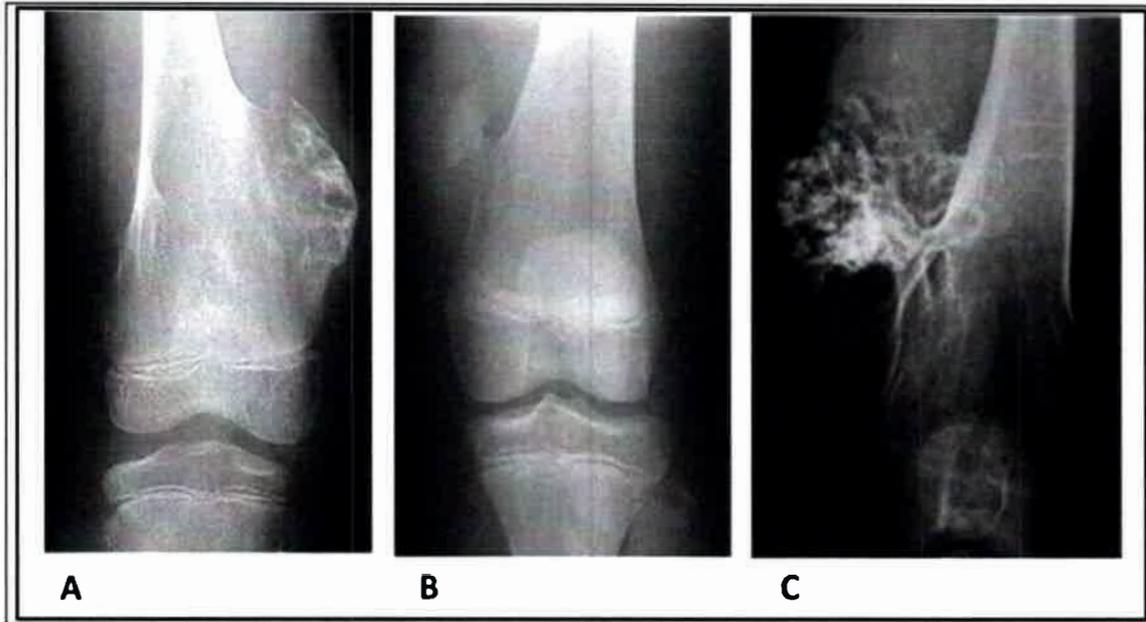
### **4.1 Manifestaciones clínicas de EXT1/EXT2-CDG**

Las manifestaciones clínicas en pacientes con EXT1/EXT2-CDG están caracterizadas por el desarrollo de tumores óseos benignos llamados osteocondromas o exostomas. Estos tumores afectan principalmente las metáfisis adyacentes a la placa de crecimiento

de los huesos endocondrales, como metáfisis distal y proximal de fémur, tibia y peroné; así como metáfisis proximales de húmero y radio, cúbitos distales; y en algunos casos la superficie de los huesos planos como escápula y/o pelvis (Alvarez et al., 2007; Francannet et al., 2001; Hameetman et al., 2007).

#### **4.2 Características de los Osteocondromas**

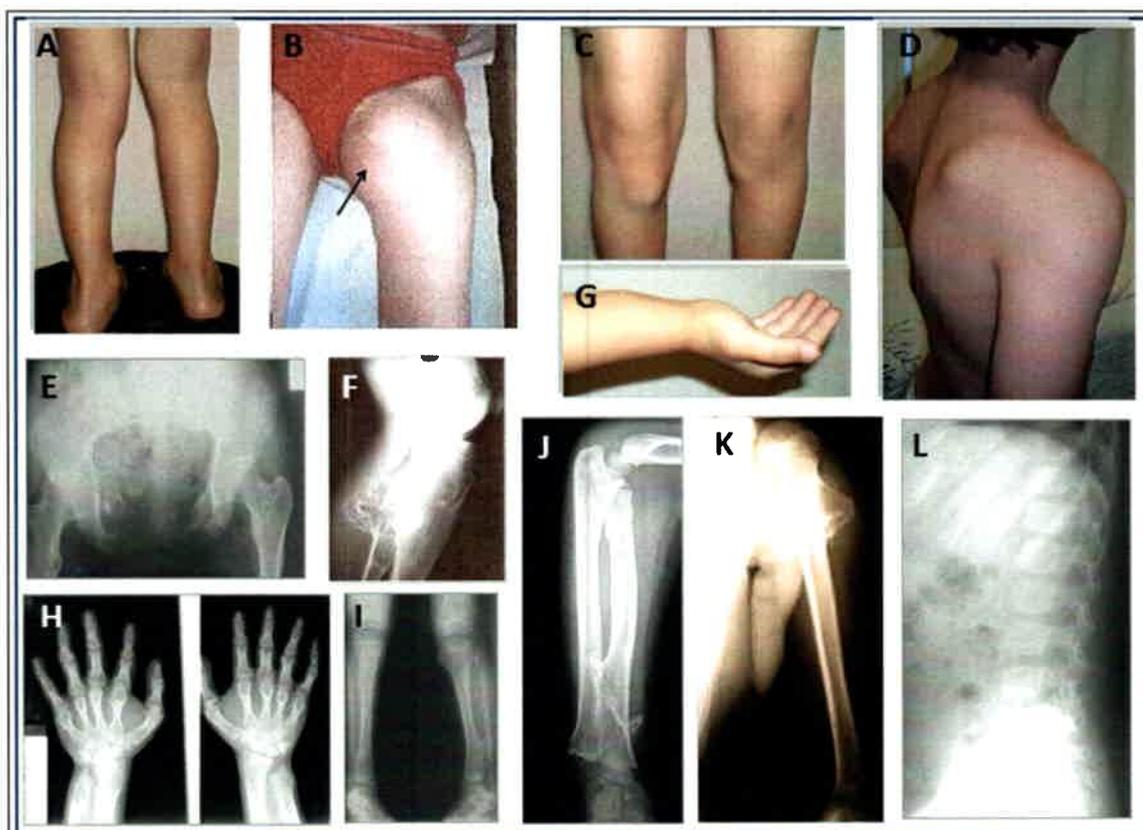
Según la definición de la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *World Health Organization*), esta lesión es una *“Proyección ósea recubierta de cartílago que emerge en la superficie externa de los huesos conteniendo una cavidad con médula que se continúa con el hueso subyacente”* (Kitsoulis et al., 2008). La presencia de osteocondromas es rara en niños o recién nacidos; se encuentran desarrollados habitualmente en adolescentes y adultos, siendo estos tumores los más frecuentes (10-15% de todos los tumores que se presentan en hueso y un 50% de todos los tumores primarios óseos benignos) (Jennes et al., 2009; Kitsoulis et al., 2008). Generalmente, la formación de nuevos osteocondromas cesa conjuntamente con el cierre de la placa epifisiaria en la finalización del crecimiento óseo (Kitsoulis et al., 2008; Roach et al., 2009). Sin embargo, la capacidad de crecimiento de los mismos se puede prolongar durante toda la vida. Los osteocondromas pueden presentar diferentes tamaños y formas, entre las cuales encontramos sésiles o pedunculados. Los osteocondromas sésiles presentan una base ancha que los une a la superficie del hueso mientras que los pedunculados se encuentran unidos mediante un “tallo” (Figura 4 A y B). Algunos osteocondromas pedunculados pueden presentar calcificaciones que les dan un aspecto arbolado, las mismas son debidas a depósitos de calcio (Figura 4C) (Bové, 2008; Francannet et al., 2001; Hameetman et al., 2004).



**Figura 4: Imágenes radiológicas de diferentes tipos de osteocondromas.** A) osteocondroma sésil, B) osteocondroma pedunculado y C) osteocondroma pedunculado calcificado (Figura adaptada de Stieber & Dormans, 2005).

En la mayoría de los casos se presentan como lesiones asintomáticas, manifestándose como una masa de crecimiento lento en el hueso afectado, sin presencia de dolor. Sin embargo, el dolor aparece con las complicaciones extra esqueléticas más frecuentes, que pueden estar asociadas con la presencia del tumor o con deformidades esqueléticas y del tejido circundante, mal alineamiento de miembros, fracturas, movimiento restringido de las articulaciones, artritis de inicio temprano o discrepancia de la longitud de las extremidades (Alvarez et al., 2006, 2007; Francannet et al., 2001; Stieber & Dormans, 2005). Los osteocondromas pueden comprimir nervios periféricos o vasos sanguíneos, siendo los más afectados frecuentemente el nervio y la arteria poplíteos, causando en algunos casos trombosis arterial y venosa, aneurismas, pseudoaneurismas, entre otras manifestaciones vasculares severas. Además, estos tumores pueden causar reducción del crecimiento óseo, siendo considerada la baja estatura como una condición intrínseca de la enfermedad (Francannet et al., 2001; Schmale et al., 1994). Raramente se observan desórdenes neurológicos, cambios periódicos en el flujo sanguíneo, asimetría facial, lesiones en cabeza y cuello, hemotórax, obstrucción intestinal y del tracto urinario y/o disfagia en pacientes con esta patología. Además se puede presentar acortamiento de metacarpios, metatarsos y falanges, varo de coxis, escoliosis y asimetría pélvicas y pectorales (Kitsoulis et al., 2008; Roach et al., 2009). Entre las complicaciones más severas se pueden mencionar dolor, isquemia aguda, flebitis por compresión nerviosa, y la transformación maligna a

condrosarcoma secundario periférico (Alvarez et al., 2006; Francannet et al., 2001; Kitsoulis et al., 2008)(Figura 5).



**Figura 5: Imágenes fotográficas de las manifestaciones clínicas y radiológicas en OM.** (A) Varo tibial; (B) y (E) condrosarcoma de pelvis y fémur proximal; (C) osteocondroma en rodilla; (D) osteocondroma escapular; (F) osteocondroma pedunculado en tibia; (G) deformidad en radio; (H) braquimetacarpios; (I) osteocondromas sésiles en tibias; (J) osteocondromas sésiles en cúbito y radio (K); (L) osteocondroma sésil en húmero y (L) Lesiones vertebrales.

#### **4.3 Osteocondromatosis Múltiple y Solitaria**

La osteocondromatosis puede manifestarse como una sola lesión esporádica, en cuyo caso se denomina osteocondroma solitario (OS), ó como múltiples lesiones frecuentemente asociadas con deformidades esqueléticas, denominándose osteocondromatosis múltiple (OM). El osteocondroma solitario (OS) es la forma de presentación más frecuente (1-2% de la población general) y no es hereditario (Schmale et al., 2010). La osteocondromatosis múltiple, presenta una prevalencia que oscila en 1/18.000 habitantes en la raza caucásica y presenta una historia familiar positiva en diferentes generaciones en un 90% de los casos (Jennes et al., 2009; Stieber & Dormans, 2005).

Los osteocondromas son altamente frecuentes en las metafisis de los huesos largos, tubulares, especialmente el fémur (30%), húmero (26%) ó tibia (43%). Las lesiones

menos frecuentes se presentan en los huesos de tarsos y carpos, rótula, cráneo, esternón, columna y cadera, aunque han sido descritas afecciones en casi todos los huesos del esqueleto (Stieber & Dormans, 2005).

#### **4.4 Condrosarcomas**

El condrosarcoma secundario periférico, es un tumor maligno y constituye el 15% con respecto a todos los condrosarcomas y es el tercer tumor óseo maligno más frecuente en adultos, después del mieloma y del osteosarcoma (Bertoni et al., 2002; Hameetman et al., 2004). La mayoría se manifiestan como condrosarcomas centrales que aparecen *de novo* en la cavidad medular, aunque aproximadamente un 15% se desarrollan como condrosarcomas secundarios periféricos a partir de la cubierta cartilaginosa de un osteocondroma (Bovéé et al., 2000). La transformación maligna desde un osteocondroma a un condrosarcoma secundario periférico se estima que ocurre en un 1–3% de los pacientes con osteocondromatosis múltiple y en <1% de pacientes con osteocondromas solitarios (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Hameetman et al., 2004).

La transformación maligna a condrosarcoma se produce muy raramente en niños, tiende a ocurrir en grupos de en pacientes de 20-60 años de edad (media=35 años), después de la finalización de formación de osteocondromas que ocurre en la pubertad, aproximadamente en la etapa posterior a la fusión de la placa de crecimiento (Bovéé & Hogendoorn, 2010).

Los condrosarcomas tienen predilección por los huesos planos, especialmente se producen a partir de transformaciones malignas en osteocondromas pélvicos (94% condrosarcoma y 6% osteosarcomas) aunque también suelen encontrarse en costillas y escápula (Bovéé et al., 1999; Kitsoulis et al., 2008). Se han descrito en menor proporción, pacientes que presentaron condrosarcomas en huesos largos, como en fémur y húmero (Kivioja et al., 2000). Los signos clínicos que hacen sospechar una transformación maligna son el dolor agudo, la incapacidad funcional, hinchazón local, el agrandamiento de la masa tumoral y el aumento del espesor de la capa cartilaginosa, especialmente luego de la maduración del esqueleto. Además se observa, mineralización irregular, presencia de bandas de tejidos blandos, pérdida de arquitectura del cartilago y áreas del tejido malignizado con necrosis (Kitsoulis et al., 2008).

La agresividad de los condrosarcomas se puede predecir de acuerdo a un sistema de clasificación histológica basada en tres parámetros: la celularidad, el grado de atipia nuclear y la actividad mitótica. Esta escala es clasificada en un rango desde grado I al III (Bovéé, 2002). La clasificación de los rangos histológicos comprende desde

condrosarcomas de bajo grado (grado I), que presentan una agresividad local y tienen una tendencia a la recurrencia, pero generalmente no producen metástasis; hasta los osteocondromas de alto grado (grado III), caracterizados por la presencia de una gran celularidad con frecuentes mitosis y significativas metástasis en 10-30% de los casos (Bové et al., 1999; Darilek et al., 2005; Oshiro et al., 1998).

Los condrosarcomas secundarios periféricos diferenciados, eventualmente pueden transformarse en condrosarcomas indiferenciados de alto grado (no cartilagosos). El proceso de indiferenciación podría producirse por factores ambientales o por mutaciones. Las células diferenciadas, localizadas en los condrosarcomas, por medio de divisiones celulares asimétricas podrían dar origen a células indiferenciadas, que proporcionarían una ventaja proliferativa que los llevaría a producir un sarcoma indiferenciado, más agresivo y de peor pronóstico, ya que producen metástasis en la mayoría de los casos (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Boveé, 2002)

## **5. Bases genéticas de la Osteocondromatosis Múltiple Hereditaria**

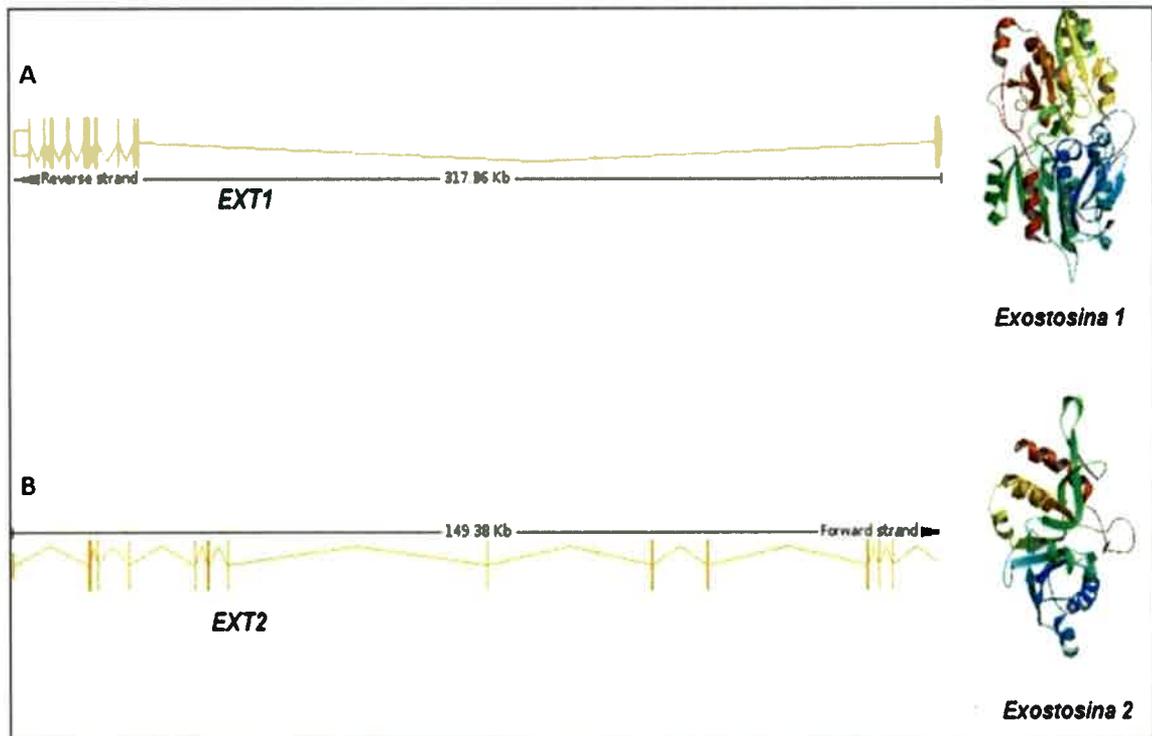
### **5.1. Genes *EXT1* y *EXT2***

Los miembros de la familia de genes *EXTs* codifican glicosiltransferasas que están involucradas en la adhesión y/o polimerización de las cadenas de heparán sulfato (HS). Estas cadenas correctamente elongadas y unidas a residuos específicos de la proteína, constituyen proteoglicanos de HS (Busse et al., 2007; Nakanaka & Kitagawa, 2008; Stickens et al., 1996; Wise et al., 1997). Los genes *EXT1* y *EXT2* en particular, poseen alta homología en sus secuencias, localizándose un 18% de secuencias homólogas en el extremo 5' y un 48% en el extremo 3', lo cual sugeriría que ambos estarían relacionados evolutiva y funcionalmente (Wuyts et al., 1996).

El gen *EXT1* (MIM 608177) está compuesto por 11 exones y contiene aproximadamente 3165 pares de bases (pb) (Ahn et al., 1995). Presenta un sitio promotor que es característico de genes constitutivos con cajas compuestas por nucleótidos CAATy no por TATA (Lüdecke et al., 1997). Se detectó la expresión ubicua de un ARNm que tiene una secuencia codificante de 2238 nucleótidos (Ahn et al., 1995; Cook et al., 1993). Posteriormente se identificó que este gen codifica dos ARNm, uno de 3287 y otro de 3359 nucleótidos (Lüdecke et al., 1997). El gen *EXT1* codifica la proteína *exostosina 1* (*EXT1*) (EC: [2.4.1.224](#)), una glicosiltransferasa de 746 aminoácidos y una masa molecular de 86,3 kDa que se encuentra localizada en la membrana del aparato de Golgi (Ahn et al., 1995; McCormick et al., 1998) (figura 6 A).

El gen *EXT2* (MIM 608210) está formado por 14 exones y dos exones alternativos que lo extienden en 110 kb, contiene 2154 pb que codifican la proteína *exostosina 2* (*EXT2*) (EC: [2.4.1.224](#)) constituida por 718 aminoácidos y una masa molecular de 82 kDa (figura 6 B) con características de proteína integral de membrana (Stickens et al., 1996). Análisis por *Northern blot* han detectado dos transcritos de ARNm, uno de 3,5 kb y un transcripto minoritario de 4 kb en la mayoría de los tejidos estudiados debido a la presencia de 2 sitios de poliadenilación en el extremo 3' del gen *EXT2*. Este hecho sugiere que este gen puede expresarse como un conjunto de proteínas mediante diferentes tipos de *splicing* alternativos del exón 1 (Clines et al., 1997; Stickens et al., 1996; Wuyts et al., 1996). Se ha demostrado, la existencia de otro transcripto trunco de la proteína *EXT2* de 70 kDa en suero que es secretado por diferentes células, el mismo es común también en otras glicosiltransferasas localizadas en Golgi (Kitagawa et al., 2001; Lind, et al., 1998).

Ambas proteínas *EXT* son glicosiltransferasas de transmembrana tipo II, se expresan de manera ubicua en la mayoría de los tejidos somáticos y están constituidas por una cola citoplasmática N-terminal, un dominio de transmembrana y un gran dominio luminal globular en el extremo carboxi-terminal (McCormick et al., 2000; Stickens et al., 1996). Debido a que ambas proteínas presentan aproximadamente un 70% de homología, modificaciones post-traduccionales y pesos moleculares similares, se sugiere que ambas evolucionaron de un origen común y que presentan funciones biológicas similares (Stickens et al., 1996; Wuyts et al., 1996). Las secuencias de cDNA entre humanos y ratones presentan un 95% de homología, pero el hecho de presentar secuencias homólogas a los genes *EXT* en invertebrados como *Caenorhabditis elegans* sugiere que la función de esta familia de genes no presenta relación únicamente con los mecanismos regulatorios del crecimiento del hueso (Clines, Ashley, & Shah, 1997; Stickens et al., 1996).



**Figura 6:** Imagen de la estructura génica de *EXT1* y *EXT2* y de la estructura terciaria de las proteínas exostosina 1 y 2. (A) A partir del transcrito de *EXT1* de 8.270 pb se sintetiza una proteína de 746 aminoácidos; y (B) del transcrito de *EXT2* de 3.136 pb, una proteína de 718 aminoácidos.

### 5.2 Genes supresores de tumores

Se postula que ambos genes, *EXT1* y *EXT2*, tendrían funciones supresoras de tumores, ya que mutaciones germinales de estos genes en pacientes *EXT1/EXT2*-CDG han desarrollado osteocondromas con alta penetrancia (Hecht et al., 1995, 1997; Ropero et al., 2004). Existen síndromes genéticos dominantes que pueden producir cáncer, en los cuales el mecanismo de malignización se produce por la pérdida de heterocigocidad de segmentos cromosómicos, reconociéndose de este modo que estos genes actúan como genes supresores de tumores, por ejemplo el retinoblastoma (13q14) o en el síndrome tricornofalangeal (TPRS) que al igual que el gen *EXT1* mapea en el cromosoma 8q24 (Hecht et al., 1997).

En los últimos años se han comenzado a estudiar diferentes marcadores genéticos, en especial aquellos que pudieran suponer un mayor riesgo de malignización de osteocondroma hacia condrosarcoma (Bové et al., 1999; Hecht et al., 1997). El hallazgo de la pérdida de marcadores genéticos en pacientes con OM con herencia familiar en pacientes con transformación maligna a condrosarcoma, en diferentes regiones del cromosoma 8q (D8S200, D8S85, D8S547, D8S527, D8S522) (Raskind et al., 1995) en el locus donde se localiza el gen *EXT1* (D8S199, D8S198, D8S85) (Francannet

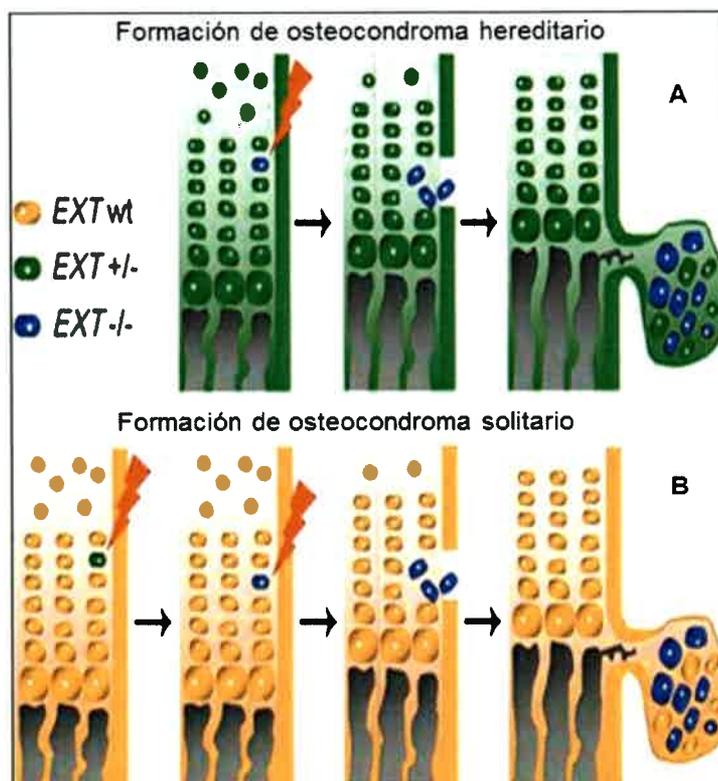
et al., 2001), y en el cromosoma 11p(D11S903, D11S905, D11S1355, D11S544) donde se localiza el gen *EXT2* (Francannet et al., 2001) sugirió la función de estos genes como supresores de tumores y que la pérdida de zonas cromosómicas podría intervenir en el desarrollo de condrosarcoma (Hecht et al., 1995; Raskind et al., 1995).

### **5.3 Teoría de la Pérdida de Heterocigocidad**

La pérdida de Heterocigocidad (*LOH*, del inglés *Loss of heterozygosity*) postula que algunos tipos de cáncer se manifiestan con un patrón de herencia autosómica dominante pero con la presencia de 2 mutaciones, una heredada a través de las células germinales, y la segunda mutación autosómica recesiva en las células somáticas, reflejan una pérdida de función a nivel celular (Knudson, 1971). El mecanismo de formación de tumores que propuso Knudson es un modelo de *2-hits*, en el cual el primer evento o "*hit*", consiste en una mutación simple en un alelo de la línea germinal que predispone a la enfermedad, mientras que el segundo "*hit*", se manifiesta en la inactivación del alelo *wild-type* (*wt*) remanente, que puede ocurrir por una mutación somática, o por eventos cromosómicos durante la recombinación mitótica (por ej. no disyunción, conversión de genes o deleciones intersticiales). Estos eventos resultarían en *LOH* y crecimiento de un osteocondroma (Figura 7) (Bovée et al., 1999; Hecht et al., 1995, 1997; Raskind et al., 1995). La pérdida del alelo *wild-type* que ocurre en casos hereditarios (Figura 7 A) (Bovée et al., 1999), así como la pérdida homocigota de ambos alelos en casos esporádicos (Figura 7 B) indican que para la formación de un osteocondroma se requiere la inactivación de ambos alelos *EXT* (Hameetman et al., 2004).

Ha sido descripta *LOH* en ambos loci de los genes *EXT1* y *EXT2* en osteocondromas y condrosarcomas esporádicos provenientes de osteocondromas solitarios como así también de osteocondromas múltiples. Estos hallazgos sugirieron que el desarrollo de estos tumores podría seguir el modelo de "*2-hits*" propuesto por Knudson, pudiendo deberse a anomalías cromosómicas que involucran regiones cercanas a los genes *EXT* (Hameetman et al., 2004; Hecht et al., 1995; Raskind et al., 1995). Más frecuentemente se observan pérdidas o rearrreglos cromosómicos del 8q24 tanto en tumores solitarios como en hereditarios. Se puso en evidencia en estudios realizados en ratones, que para la formación de un osteocondroma es necesario que ocurra *LOH* en los genes *EXT1* ó *EXT2*, sugiriendo que la célula de origen es un condrocito en proliferación (Jones et al., 2010). Se ha estudiado la organización primaria de los condrocitos en la placa de crecimiento en un modelo de hueso de mamíferos en desarrollo y se propuso la existencia de células normales *EXT*(*wt/wt*) (ambos alelos

*wild-type*) ó EXT(+/-) (un alelo inactivado y el otro *wild-type*); conjuntamente con células EXT(-/-) (ambos alelos inactivados), en la cubierta cartilaginosa de los osteocondromas. Esta composición heterogénea de células localizadas en el tejido cartilaginoso de los osteocondromas se define como “mosaico” (Figura 7)(Bové, 2010).



**Figura 7: Modelohipotético de formación de un osteocondroma.** (A) En pacientes con OM la formación de un osteocondroma resulta a partir de un segundo “hit” en una célula en proliferación en la placa de crecimiento. Se postula que la célula pierde la polaridad y comienza a crecer hacia afuera de la superficie del hueso a causa de una señal distorsionada de *Indian hedgehog* (Ihh). En la cubierta cartilaginosa existe un mosaiquismo formado por células EXT (-/-) intercaladas con células EXT (+/-). (B) En osteocondromas solitarios se necesitan 2 “hits” de mutaciones somáticas para formación de un osteocondroma (imagen extraída de Bovée, 2010).

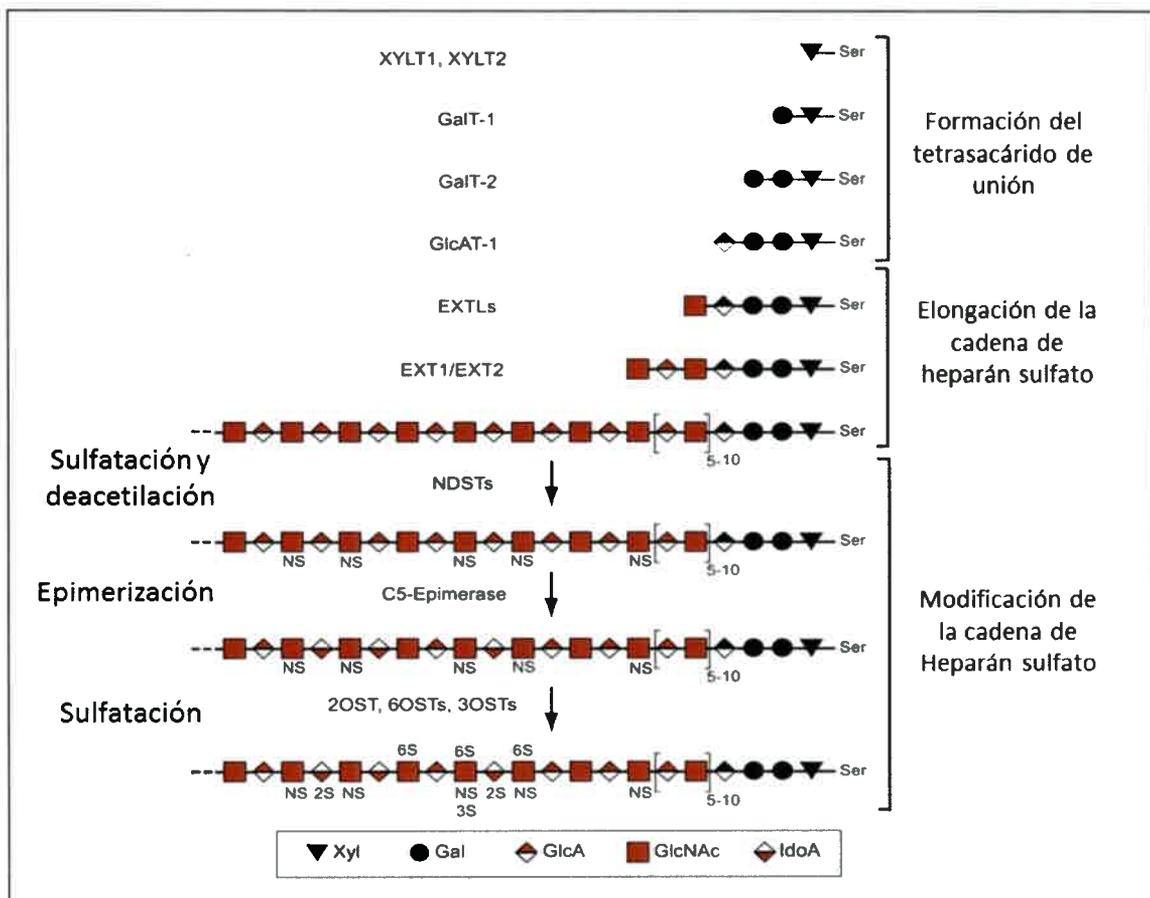
## 6. Biosíntesis de proteoglicanos de heparán sulfato

El proceso de síntesis del HS se inicia con la formación de un “tetrasacárido de unión” formado por cuatro azúcares *xilosa-galactosa-galactosa-ácido glucurónico* (Xyl-Gal-Gal-GlcUA). El primer residuo en la formación del HS, la xilosa, es agregado por una enzima xilosiltransferasa (XYLT1 o XYLT2) en el RER y luego continúa el proceso en el Aparato de Golgi donde se agregan secuencialmente 2 residuos de galactosa por medio de las enzimas galactosiltransferasa 1 y 2 (GalT-1 y GalT-2) respectivamente (Esko & Lindahl, 2001). La síntesis del tetrasacárido se completa con el agregado de un residuo de ácido

glucurónico por medio de la enzima glucuroniltransferasa (GlcAT-1). Este núcleo o *core*, se une a un residuo serina de una proteína dando origen a un proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) (Duncan et al., 2001). El tetrasacárido sintetizado actúa como intermediario al cual se van adicionando alternativamente N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido glucurónico (GlcA), elongando de esa manera la cadena de HS (Kreuger & Kjellén, 2012). Otros miembros de la familia de genes *EXT*, como el conjunto de genes *EXT-like* (*EXTL2* y *EXTL3*), codifican proteínas que catalizan reacciones de GlcNAc-transferasas y que comienzan la polimerización del HS. *EXTL2* codifica para una enzima, la  $\alpha$ 1,4-N-acetil-hexosaminiltransferasa I (GlcNAc-TI), que transfiere el primer residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) al extremo no reductor del tetrasacárido aceptor, comenzando la polimerización de las cadenas de HS (Busse et al., 2007; Kreuger & Kjellén, 2012; Sandell, 2009). *EXTL2* es considerada la principal enzima encargada de la iniciación de la elongación del HS adicionando el residuo GlcNAc, y está demostrada la existencia un mecanismo de regulación complejo conjuntamente con la enzima *EXTL3* (Holmborn et al., 2012; Kreuger & Kjellén, 2012). Se ha sugerido que *EXTL2* interviene además en la regulación del balance de los niveles de diferentes GAGs, participando en la iniciación de la biosíntesis tanto de las cadenas de heparán sulfato como en las de condroitín sulfato (Kreuger & Kjellén, 2012). Posteriormente a la adición del residuo GlcNAc, la elongación de la cadena de HS es catalizada por las enzimas exostosina 1 (*EXT1*) ( $\beta$ 1,4-glucuroniltransferasa) y exostosina 2 (*EXT2*) ( $\alpha$ 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa) formando un polímero por la adición repetida de un disacárido, formado por ácido glucurónico o ácido urónico (GlcUA) unido en  $\beta$ 1-4 con GlcNAc (Figura 8) (Lind et al., 1998; McCormick et al., 2000).

Las proteínas *EXT1* y *EXT2* son glicosiltransferasas de transmembrana de tipo II, que forman un complejo hetero-oligomérico localizado en el Aparato de Golgi, el cual posee mayor actividad glicosiltransferasa en conjunto comparado con cada enzima por sí sola, sugiriendo que el dímero o complejo hetero-oligomérico representa la forma biológica relevante de estas enzimas (Figura 8) (Duncan et al., 2001; McCormick et al., 2000). La cadena de polisacárido nascente [GlcUA-GlcNAc] $_n$  será modificada luego por una familia de enzimas bifuncionales, N-deacetilasa/N-sulfotransferasa (NDST), las cuales catalizan la de-acetilación y la N-sulfatación de unidades de GlcNAc (Bishop et al., 2007; Esko & Lindahl, 2001). Posteriormente, ocurre la epimerización de las unidades de GlcUA  $\beta$ 1-4 en ácido Idurónico y una 3-O-sulfatación del residuo GlcNAc. Este proceso de modificación no ocurre de manera uniforme, dando como resultado una variedad de isoformas que muestran distribuciones específicas en diferentes tejidos (Duncan et al., 2001; McCormick et al., 2000; Senay et al., 2000). La figura 8

representa mediante un esquema, las etapas de la biosíntesis de HS en el aparato de Golgi a través de la acción compleja de diferentes enzimas (Figura 8).



**Figura 8: Representación esquemática de las etapas de biosíntesis de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG).** Inicialmente se sintetiza un tetrasacárido que se une a un residuo serina de la proteína que formará el HSPG. Posteriormente diferentes glicosiltransferasas (GlcNAc-TI) codificadas por los genes *EXTL* adicionan un residuo GlcNAc. Luego el complejo heterooligomérico localizado en el complejo de Golgi formado por EXT1/EXT2 elongan la cadena nascente de HS alternando residuos de GlcUA y GlcNAc. Posterior a la síntesis ocurre una modificación en las cadenas de HS, deacetilación y sulfatación por medio de enzimas NDSRs, epimerización por C5-epimerasa y sulfatación por medio de diferentes enzimas OST (Kreuguer et al., 2012 con modificaciones).

## 7. Placa de crecimiento epifisaria y etapas de crecimiento del hueso endocondral

La placa de crecimiento epifisaria es un molde cartilaginoso altamente organizado, necesario para la elongación de los huesos largos, proceso que ocurre durante la osificación endocondral. El mecanismo de formación de hueso endocondral en la placa de crecimiento epifisaria se produce por un proceso de moldeado que comienza con la proliferación de los condrocitos a través de secuencias sucesivas de división celular con secreción de matriz extracelular e hipertrofia celular, continuando con la apoptosis de los condrocitos y la consiguiente mineralización y osificación de la matriz cartilaginosa del hueso (Campbell & Kaplan, 1992).

En una representación esquemática de la placa de crecimiento epifisaria, se inicia con la condensación de células mesenquimáticas productoras de un molde cartilaginoso y posteriormente es remplazado por tejido óseo (De Andrea & Hogendoorn, 2012) (Figura 9). Durante la formación de las condensaciones celulares son muy importantes las interacciones célula-célula, a través de moléculas como N-caderinas y Moléculas de Adhesión Celular (CAM), las cuales establecen un centro de agregación que recluta a las células mesenquimáticas desde el tejido circundante. El factor de transcripción Sox9 juega un rol importante en la diferenciación desde células progenitoras de condrocitos (pre-condrocitos) a condrocitos maduros; modulando la expresión de genes específicos de cartilago que codifican a proteínas como colágeno tipo II y tipo IX (Figura 9 A) (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Kronenberg, 2003). La presencia de proteínas morfogenéticas de hueso BMP-2 y BMP-4, detienen el crecimiento de las condensaciones mesenquimáticas e inician la diferenciación de los pre-condrocitos a condrocitos maduros. Durante esta etapa, los condrocitos maduros se rodean de una abundante matriz extracelular cartilaginosa, donde las interacciones célula-célula de las condensaciones mesenquimáticas son remplazadas por las interacciones de las células con los proteoglicanos de la matriz extracelular. Numerosos procesos biológicos contribuyen a la formación y organización de la placa de crecimiento epifisaria, especialmente las interacciones que establecen los condrocitos con los proteoglicanos de la matriz extracelular (Figura 9B) (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Kronenberg, 2003). Estas interacciones intervienen en la polaridad celular, contribuyendo tanto a la morfogénesis de tejidos normales, como al crecimiento neoplásico (ostecondromas y condrosarcomas) (De Andrea & Hogendoorn, 2012).

Estructuralmente, la placa de crecimiento puede ser dividida en tres zonas diferentes:

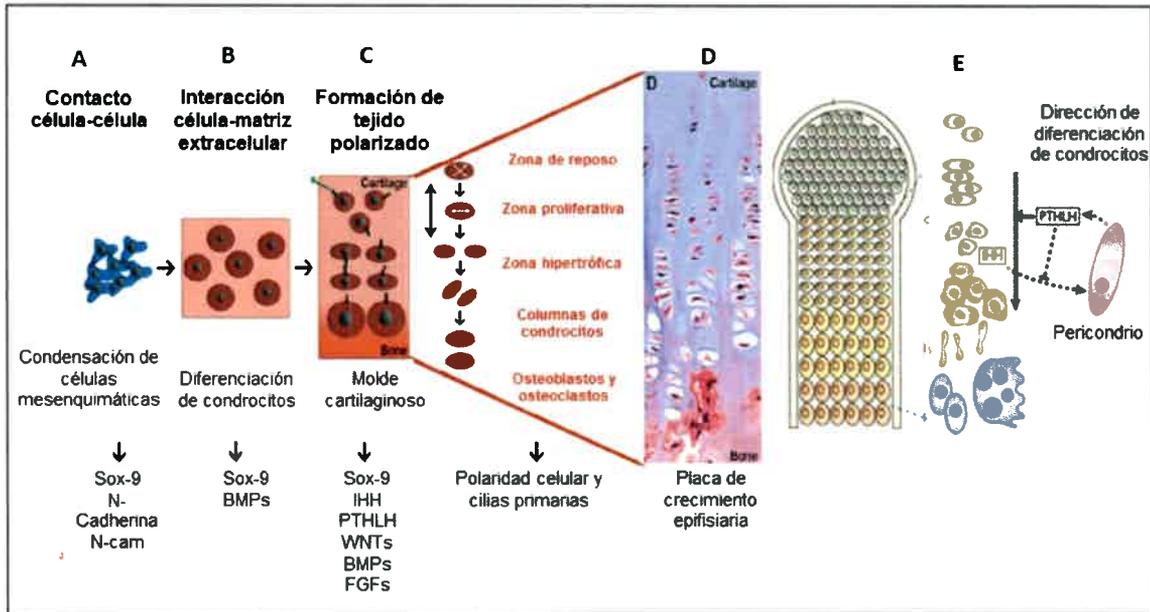
1) Zona de reposo: Formada por condrocitos no polarizados, organizados irregularmente, que sirven como precursores de condrocitos proliferativos, conjuntamente con un pool de *stem cells*. (Figura 9 C).

2) Zona proliferativa: Representada por columnas de condrocitos alineados y en parte superpuestos, formación típica de la placa de crecimiento epifisiaria, generada por múltiples procesos de división celular de condrocitos perpendiculares al eje longitudinal del hueso en crecimiento. Para poder producir cambios en su morfología, los condrocitos requieren ser adheridos a la matriz extracelular cartilaginosa. Se sugiere que en este proceso intervienen las proteínas Integrinas  $\beta 1$ ; familia importante de receptores proteicos que además, regularían la forma y la rotación de los condrocitos (Figura 9 C)(Aszodi et al., 2003; De Andrea & Hogendoorn, 2012).

3) Zona hipertrófica: Los condrocitos detienen su proliferación y cambian su perfil de expresión de proteínas sintetizando colágeno tipo X, preparando así a la matriz cartilaginosa circundante para el proceso de mineralización con la posterior transformación a tejido óseo (Figura 9 C) (De Andrea et al., 2012).

Las interacciones de los condrocitos con la matriz extracelular se establecen a través de las cilias primarias, siendo estas estructuras críticas en los procesos de regulación de las funciones de la placa de crecimiento epifisiaria, donde presentan una orientación los condrocitos proliferativos e hipertróficos, paralela al eje longitudinal del hueso (Figura 9 C)(De Andrea & Hogendoorn, 2012).

Podríamos generalizar que las interacciones célula-célula, y célula-matriz son dependientes del contexto y pueden exhibir variaciones específicas dependiendo tanto del estado de desarrollo del tejido u órgano, del tipo de células involucradas, así como de la presencia de factores locales y sistémicos(Huegel et al., 2013a).



**Figura 9: Diferenciación de condrocitos en la placa de crecimiento endocondral según las diferentes etapas del desarrollo.** (A) Condensación de células mesenquimáticas, donde intervienen los contactos célula-célula mediados por proteínas Sox-9, N-Cadherinas y N-cam (B) Diferenciación de los condrocitos, donde intervienen las interacciones de la célula con la matriz extracelular mediante proteínas Sox-9 y BMPs. (C) Formación del tejido polarizado, donde intervienen proteínas Sox-9, IHH, Pthlh, WNTs, BMPs, FGFs. (D) Placa de crecimiento epifisaria madura mostrando las diferentes zonas. (E) Dirección de diferenciación de los condrocitos, interacciones entre IHH y Pthlh (imagen adaptada de De Andrea et al., 2012 y Boveé, et al., 2010).

## 8. Mecanismos de señalización de HSPG en la placa de crecimiento epifisaria

En *Drosophila melanogaster* se ha identificado y reconocido el mecanismo de los HSPGs involucrado en la formación del gradiente, señalización y difusión de morfógenos como *hedgehog* (Hh), decapentaplegico (Dpp) y algunas moléculas de la familia de *wingless* (Wg) que ejercen roles esenciales durante las etapas del desarrollo (Häcker et al., 2005; Nadanaka & Kitagawa, 2008; Takeiet al., 2004). En humanos existen homólogos a dichos morfógenos; *Indian* y *Sonic hedgehog* (Ihh; Shh), Factor de Crecimiento Transformante (TGF), Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMPs), y proteínas *Wingless* (WNTs), entre otros (Kronenberg, 2003; Schrage et al., 2009). Los factores de señalización celular *Indian Hedgehog* (IHH), la proteína relacionada a la hormona paratiroidea (PTHrP) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), conjuntamente con los HSPGs, participan en la regulación de la proliferación y diferenciación de los condrocitos en la placa de crecimiento epifisaria (Koziel et al.,

2004; Kronenberg, 2003; Nakanaka & Kitagawa, 2008b; Ornitz & Marie, 2002; Sandell, 2009).

Estas moléculas de señalización (FGFs, TGFs, BMPs) así como a las proteínas WNTs, se unen a las cargas negativas de las cadenas del HS (Allen & Rapraeger, 2003; Bishop et al., 2007). Los HSPGs regulan la distribución del gradiente de morfógenos a través de la matriz extracelular, interviniendo en la unión con sus respectivos receptores, estimulando los mecanismos de secreción y de respuesta celular (Häcker et al., 2005). Los condrocitos ubicados a lo largo de la placa de crecimiento epifisaria, estarían expuestos a diferentes concentraciones y tipos de morfógenos (De Andrea & Hogendoorn, 2012). La transducción de estas moléculas de señalización es crucial para la formación de las diferentes zonas de la placa de crecimiento epifisaria anteriormente descritas, ya que cada una de las mismas presentan diferentes patrones de proliferación, diferenciación y morfología celular (De Andrea & Hogendoorn, 2012).

El balance entre la proliferación y la hipertrofia de los condrocitos es regulado por un mecanismo de retroalimentación negativo que involucra a IHH y a PTHrP. Los HSPGs establecen un gradiente de concentración de IHH regulando su difusión y protegiéndolos de su degradación (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Kronenberg, 2003; Minina et al., 2001). El factor IHH es considerado un regulador clave de la placa de crecimiento epifisaria, ya que coordina la proliferación y diferenciación de los condrocitos, así como la diferenciación de los osteoblastos. IHH favorece la proliferación de los condrocitos de manera directa e indirectamente estimulando la síntesis de PTHrP (Kronenberg, 2003). Los condrocitos pre-hipertróficos producen IHH, que al difundir fuera de su sitio de síntesis, estimula la proliferación de un *pool* de condrocitos de la zona de reposo y de la zona proliferativa (Figura 9 D) (Bové, 2010; De Andrea & Hogendoorn, 2012; Kronenberg, 2003). IHH envía señales al pericondrio y estimula la síntesis de PTHrP, induciendo de este modo el crecimiento de condrocitos en la zona proliferativa (Kronenberg, 2003). Por otro lado, PTHrP difunde hacia la zona pre-hipertrófica y suprime la secreción de IHH, inhibiendo así la diferenciación de los condrocitos pre-hipertróficos en condrocitos hipertróficos por un mecanismo de retroalimentación negativa e induce la apoptosis de los mismos con la consecuente osificación del pericondrio, reemplazando luego a los condrocitos por osteoblastos formadores de hueso (Figura 9D) (Bové & Hogendoorn, 2010; De Andrea & Hogendoorn, 2012; Kronenberg, 2003; Schrage et al., 2009). Este mecanismo de regulación también determina la longitud de los huesos largos, ya que en la etapa de diferenciación hipertrófica, los condrocitos detienen su crecimiento y comienzan a desarrollarse los osteoblastos que producen un collar óseo con el consiguiente cierre de

la placa de crecimiento epifisiaria (Kronenberg, 2003). Además, IHH induce la expresión de numerosas BMPs en la zona que limita entre el pericondrio/periostio y los condrocitos proliferativos. Las BMPs conjuntamente con IHH inducen la proliferación de los condrocitos y adicionalmente estimulan la expresión de más moléculas de IHH en los condrocitos pre-hipertróficos, favoreciendo el aumento de la longitud de las columnas de condrocitos (Kronenberg, 2003). Independientemente de las señales de IHH/PTHrP, las proteínas BMPs, retardan el proceso de la diferenciación hipertrófica de los condrocitos inhibiendo la apoptosis con la consiguiente osificación de la matriz cartilaginosa (Figura 9 C) (Minina et al., 2001).

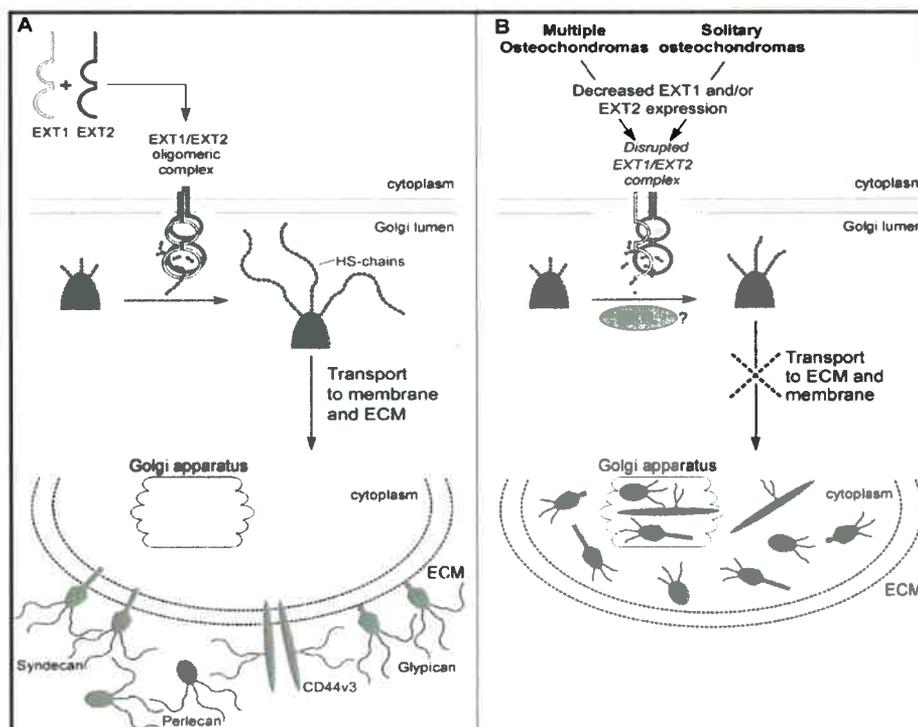
Otro aspecto biológico importante de la placa de crecimiento epifisiaria está representado por la modificación extracelular que sufren las cadenas de HS y HSPGs llevada a cabo por medio de enzimas como la heparanasa y sulfatasas (Ai et al., 2007; Fux et al., 2009). La heparanasa, es una endoglucuronidasa que interviene en la remodelación estructural de la matriz extracelular durante la invasión celular y favorece la liberación de factores de crecimiento, por lo cual esta enzima está involucrada en el desarrollo de variados tipos de cáncer (Ilan et al., 2006). La heparanasa además posee un rol importante en la diferenciación tardía de los condrocitos durante la osificación endocondral normal (Trebicz-Geffen et al., 2008; Yang et al., 2010). Esto sugiere que una regulación en la degradación del HS podría también intervenir en los mecanismos de señalización durante el proceso de formación del hueso endocondral (Bové & Hogendoorn, 2010; De Andrea & Hogendoorn, 2012; Huegel, et al., 2013).

### **9. Hipótesis de formación de los osteocondromas**

Mutaciones que afecten tanto la porción proteica como a enzimas que participan en la biosíntesis, modificación ó degradación de la cadena del HS pueden comprometer potencialmente la función de los HSPGs, contribuyendo así al desarrollo de procesos patológicos. Alteraciones en la formación de las cadenas de HS causarían por lo tanto, un desbalance en su función extracelular y una morfogénesis anormal, que podría llevar al desarrollo de diferentes enfermedades (Selleck, 2000). Se han descrito numerosas patologías con fenotipos esqueléticos y cráneo-faciales relacionados con mutaciones en genes que codifican a enzimas que intervienen en la síntesis, modificación o en la degradación de los HSPGs (Bishop et al., 2007).

Existen diferentes hipótesis acerca de la alteración de las cadenas de HS, según Hameetman et al., 2007, la inactivación en alguno de los genes *EXT1* ó *EXT2* produciría

una alteración en la función del complejo proteico EXT1/EXT2, dando como resultado una alteración en la síntesis de las cadenas de HS. Las cadenas alteradas de HSPGs no serían transportadas adecuadamente hacia la membrana y/o matriz extracelular, resultando en una acumulación intracelular de HSPGs, quedando retenidos en el citoplasma y en el Aparato de Golgi de las células tumorales (Figura 10 B) (Hameetman et al., 2007; McCormick et al., 2000). Otros autores también sugieren, que alteraciones en alguno de los genes *EXT* produciría la elongación inadecuada de las cadenas de HS generando defectos en la señalización de diferentes factores de crecimiento y en las interacciones entre las células y la matriz extracelular, lo cual daría como resultado un mecanismo de osificación endocondral anormal que conduciría a la formación de osteocondromas (Huegel et al., 2013; Koziel et al., 2004; Kronenberg, 2003; Lind et al., 1998; Nakanaka & Kitagawa, 2008b; Ornitz & Marie, 2002; Sandell, 2009).



**Figura 10. Representación del complejo EXT1/EXT2 en la síntesis de HSPG.** (A) Mecanismo hipotético en tejidos normales donde EXT1 y EXT2 forman un complejo hetero-oligomérico involucrado en la biosíntesis de cadenas normales de heparán sulfato en el Golgi. EXT1/EXT2 polimerizan disacáridos de HS sobre la cubierta proteica de un proteoglicano, para formar los proteoglicanos unidos al heparán sulfato (HSPGs) los cuales serán transportados hacia la membrana celular o matriz extracelular (A). En tejido de osteocondroma ó condrosarcoma (B). Los niveles de expresión disminuidos de EXT1 y/o EXT2 en osteocondromas solitarios, hereditarios y condrosarcomas alterarían la síntesis de HS y probablemente las proteínas EXT-like, podrían sintetizar cadenas más cortas de HS, que al formar los HSPGs anormales no tienen la capacidad de transportarse adecuadamente hacia la membrana ó matriz extracelular, quedando retenidas en el Golgi y citoplasma de las células tumorales (imagen extraída de Hameetman et al., 2007).

De acuerdo con el modelo hipotético planteado por De Andrea & Hogendoorn, 2012, la formación de los osteocondromas podría ocurrir cuando un condrocito que posee una mutación germinal en el gen *EXT1* ó en *EXT2*, desarrolla el "hit" de inactivación de la segunda copia del mismo gen. La expansión clonal de estos condrocitos mutantes daría lugar a cadenas anormales de HSPGs produciendo una perturbación local en la difusión de IHH. Este cambio en el área de difusión podría causar la pérdida de la polaridad de las células, ocasionando una proliferación de los condrocitos en una dirección equivocada en la placa de crecimiento. Por otro lado, IHH es una molécula señal importante para el mecanismo de osificación del pericondrio adyacente a la placa de crecimiento, por lo tanto, la difusión anormal de IHH podría causar además, un defecto en la osificación del pericondrio facilitando aún más el desarrollo de un osteocondroma (Figura 9) (Bové et al., 2010; De Andrea & Hogendoorn, 2012). Se ha demostrado que en la cubierta de los osteocondromas se encuentran mosaicos formados por condrocitos que poseen inactivación homocigota de los genes *EXT1/EXT2* orientados al azar que presentan alteraciones en la polaridad (orientación aleatoria de las cilias primarias y ausencia de organelas), conjuntamente con condrocitos portadores de genes *EXT1/EXT2* funcionales (*wild-type*) organizados en columnas que mantienen la polaridad (cilias primarias alineadas en un eje común) (De Andrea & Hogendoorn, 2012; De Andrea et al., 2010). Recientemente pudo demostrarse en modelos de cultivos celulares humanos y animales, la presencia de células con actividades de osteosina funcionales dentro de la cubierta cartilaginosa de osteocondromas que corresponderían a condrocitos *wild type* (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Jones et al., 2010; De Andrea et al., 2010). Estos hallazgos sugieren que las células *wild-type* de la cubierta de los osteocondromas podrían proveer un nivel umbral de HSPGs, creando así un ambiente propicio para la proliferación de los condrocitos que poseen inactivación homocigota de los genes *EXT1/EXT2* (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Hilton et al., 2005). De esta manera, las células con inactivación homocigota de *EXT1/EXT2* perderían la capacidad de responder a las señales de polaridad de las cilias primarias y al encontrarse localizadas inmediatamente adyacentes al pericondrio, serían capaces de escapar al gradiente de PGs generado por los condrocitos *wild-type* y formarían las proyecciones perpendiculares por fuera del hueso conocidas como osteocondromas (De Andrea & Hogendoorn, 2012). Debido a que las células *wild-type* representan la población celular mayoritaria de los tumores inmaduros, se postula que para la iniciación de un osteocondroma sólo es necesaria una pequeña fracción de condrocitos que presenten inactivación de los genes *EXT* (Figura 10) (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Matsumoto et al., 2010). Por el

contrario, se ha demostrado en pacientes adultos que la población mayoritaria de células de la cubierta de los osteocondromas está constituida por condrocitos que presentan inactivación de los genes *EXT*. Este hecho sugiere que durante la maduración del tumor existe un incremento en el número de condrocitos con inactivación de los genes *EXT*, presentando un rango variable de este tipo de células según la edad del paciente (De Andrea et al., 2010).

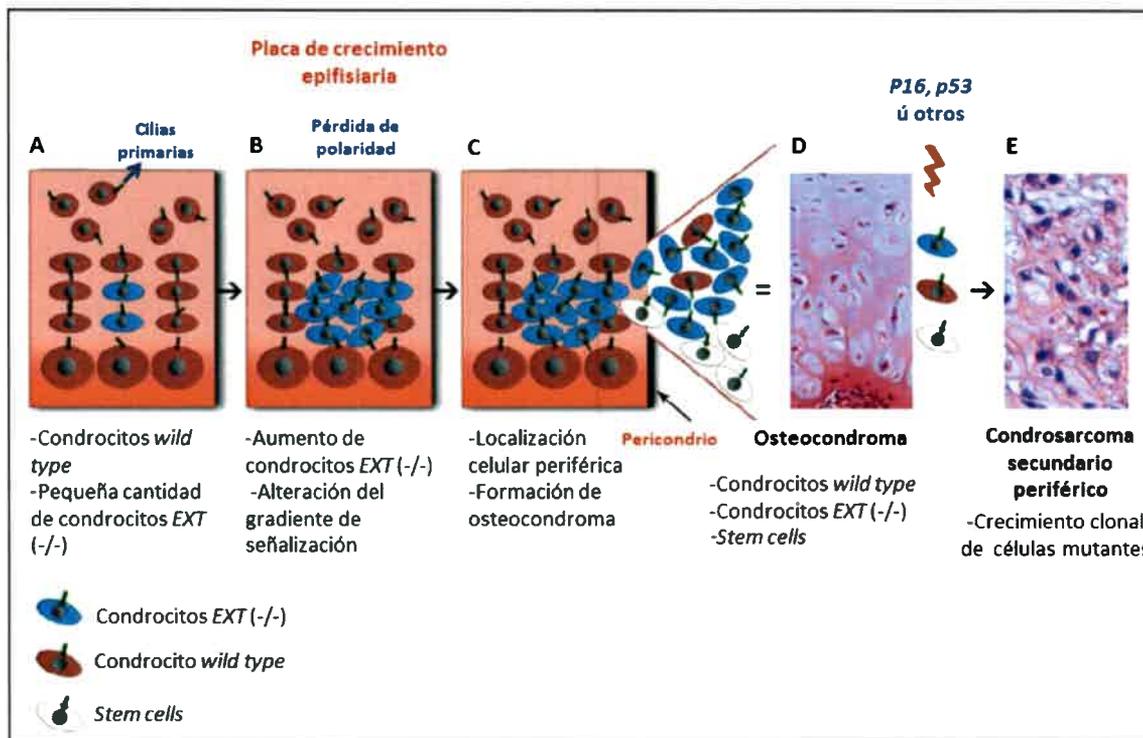
Los osteocondromas cesan su crecimiento luego de la maduración sexual y eventualmente podrían ser reabsorbidos cuando constituyen lesiones pequeñas. Este hecho podría deberse a que tanto la placa de crecimiento epifisaria normal así como la cubierta de los osteocondromas, probablemente estén sujetos a una regulación hormonal (Passanise et al., 2011). La proporción del tipo de células que constituyan este mosaico en la cubierta epifisaria determinará la permanencia o la reabsorción de un osteocondroma. Cuando la proporción mayoritaria de células esté constituida por condrocitos con inactivación de los genes *EXT*, éstos protegerían a la cubierta epifisaria de los mecanismos de reabsorción generados por las células *wild-type*, permitiendo así la permanencia del osteocondroma. Por el contrario, cuando la principal población celular esté representada por condrocitos *wild-type*, estas células favorecerían la reabsorción de los osteocondromas (De Andrea & Hogendoorn, 2012).

### **10. Hipótesis de la progresión desde osteocondromas a condrosarcomas**

Considerando que los osteocondromas son proyecciones óseas que emergen de la superficie externa de los huesos, se ha sugerido que se encuentran expuestos a constantes riesgos de injurias y micro-traumas que podrían conducir a que algunas células adquieran alteraciones genéticas responsables de la transformación maligna. De acuerdo a lo expresado anteriormente, se postula que las células que presentan inactivación homocigota de los genes *EXT* generarían un ambiente permisivo que facilitaría a que las células *wild-type* conjuntamente con las *stem cells* localizadas en la cubierta de los osteocondromas y de tejidos circundantes adquieran alteraciones genéticas secundarias (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Reijmers et al., 2010; Reijnders et al., 2011).

El micro-medioambiente en el que se encuentran los osteocondromas puede ejercer influencias tanto en los mecanismos de supresión como en los de la formación del tumor. El micro-medioambiente provee a las células de moléculas de señalización que intervienen en la proliferación, diferenciación y muerte celular, regulando la arquitectura y la remodelación tisular. Es reconocido también que el micro-medioambiente que rodea

a las células puede suprimir y revertir procesos neoplásicos, aunque también interviene en la modulación de los procesos de formación, crecimiento y difusión de los tumores. Esto significa que el micro-medioambiente puede alterar a la homeostasis de un tejido y consecuentemente promover el desarrollo de la transformación maligna. Numerosas causas podrían conducir a la desestabilización de la homeóstasis de un tejido, como por ejemplo la producción celular de compuestos tóxicos que alterarían a moléculas de señalización. Recientemente se ha descrito un modelo de oncogénesis "basado en un nicho" en el cual tanto las células benignas como malignas en un tejido podrían crear un cambio en un "nicho" ó micro-medioambiente de un tipo celular que podría iniciar la transformación maligna de otro tipo celular diferente (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Raaijmakers et al., 2010). El condrosarcoma secundario periférico es un tumor maligno cartilaginoso que emerge de la cubierta de cartílago de un osteocondroma. Mientras que mutaciones homocigotas en los genes *EXT1/EXT2* son cruciales para la formación de los osteocondromas, los condrosarcomas secundarios periféricos podrían originarse por el crecimiento clonal tanto de *stem cells*, condrocitos *wild-type* o de condrocitos que presenten inactivación homocigota de los genes *EXT* que adquieran posteriormente otras alteraciones en otros genes diferentes a *EXT* (*p16*, *p53* and *RB1*) que les confieran una ventaja proliferativa con la consecuente transformación maligna a condrosarcoma (Figura 11) (De Andrea & Hogendoorn, 2012; Mohseny & Hogendoorn, 2011). La transformación maligna a condrosarcoma secundario periférico está caracterizada por un alto porcentaje de pérdida de heterocigocidad (por ej. *CDKN2A/p16*, *TP53*, *RB1*) y se han descrito alteraciones cromosómicas y ploidías en un rango que abarca desde la mitad al doble de la cantidad de ADN que se encuentra en los tumores malignizados (Bovée et al., 1999; Hallor et al., 2009; De Andrea et al., 2012).



**Figura 11: Esquema hipotético de la malignización de un osteocondroma a condrosarcoma secundario periférico.** A) Iniciación del osteocondroma, presencia de células *wild-type* y pequeña cantidad de condrocitos *EXT (-/-)*. B) Aumento del número de condrocitos *EXT (-/-)* que producen una alteración del gradiente de señalización y pérdida en la polaridad celular. C) Localización celular periférica cercana al pericondrio, se produce una expansión perpendicular a la placa de crecimiento formando un osteocondroma. D) Imagen histológica de la placa de crecimiento epifisaria de un osteocondroma. E) Mutaciones en genes *p16*, *p53*, etc en células *wild-type*, *EXT (-/-)* y *stem cells*, la expansión clonal de las diferentes células mutantes conduce a la formación de un condrosarcoma secundario periférico (imagen adaptada de De Andrea & Hogendoorn, 2012).

## 11. Diagnóstico clínico y molecular de Osteocondromatosis

El diagnóstico de sospecha de osteocondromatosis es de exploración clínica, sumada a la imagen de la/s lesión/es mediante rayos X u otros estudios como RMN, TAC y/o estudios histológicos de biopsias, en el caso de ser necesario. El diagnóstico diferencial con otros desórdenes esqueléticos como displasia epifisaria hemimélica (Enfermedad de Trevor ó aclasia tarsoepifiseal), metacondromatosis (Bové et al., 2006), encondromatosis (Enfermedad de Ollier ó Síndrome de Manfucci) (Schwartz et al., 1987), es muy importante. Estas patologías descritas presentan diferencias clínicas con respecto a la osteocondromatosis que pueden ser identificadas radiológicamente, así como diferencias etiológicas que no involucran a alteraciones en los genes *EXT* (Bové, 2008; Hameetman et al., 2004). Por este motivo, es sumamente importante realizar el análisis molecular de los genes *EXT* a partir de la determinación clínica

deOM. No se han encontrado diferencias en la presentación clínica entre pacientes que presentan mutaciones en el gen *EXT1*, en *EXT2* o sin la presencia de mutaciones exónicas en estos genes (Kojima et al., 2008; Signori et al., 2007; Wuyts et al., 1998; Wuyts et al., 2005).

Se han propuesto numerosos estudios en el análisis de las variables clínico-radiológicas para determinar escalas de severidad y una posible asociación entre el genotipo y el fenotipo (Alvarez et al., 2006; 2007; Francannet et al., 2001).

Hasta el momento se han utilizado diferentes técnicas para la búsqueda de mutaciones en los genes *EXT1* y *EXT2* de diferentes pacientes con osteocondromatosis múltiple, siendo la metodología de amplificación por PCR y secuenciación la más comúnmente utilizada (Jennes et al., 2008, 2009; Lonie et al., 2006; Pedrini et al., 2005; Wuyts et al., 1998). Mediante la complementación con otras metodologías como el ensayo de MLPA (del inglés "*Multiplex Ligation Probe Amplification*") que permite detectar grandes ó medianas deleciones ó inserciones que no pueden detectarse por PCR, se han encontrado un 10% de grandes deleciones intragénicas que involucran a uno o varios exones de *EXT1* o *EXT2* en pacientes con OM (Vink et al., 2005). Sin embargo, a causa de la ausencia de mutaciones en *EXT1-EXT2* en un porcentaje de pacientes (15-30%) se propuso la hipótesis de un gen adicional que puede causar OM o de posibles moduladores de la expresión génica, ambos objetos de estudio de diferentes grupos de investigación en la actualidad (Le Merrer et al., 1994; Wise et al., 1997).

## **12. Afectación de tejidos no esqueléticos**

Se ha demostrado por medio de estudios realizados en ratones, que mutaciones homocigotas en los genes *EXT1* y *EXT2* producen fallas en el proceso de gastrulación durante la embriogénesis temprana, impidiendo a los embriones el desarrollo hasta llegar al nacimiento (Jones, 2011; Lin et al., 2000).

Se han estudiado las alteraciones en la fisiología de otros tejidos como el riñón (Chen et al., 2008), células de las crestas neurales (Iwao et al., 2009), ojos (Iwao et al., 2010), endotelio (Kucharzewska et al., 2010) e incluso células como linfocitos (Garner et al., 2008), así como en el desarrollo del cerebro y el direccionamiento axonal (Inatani M, 2003) causados por la pérdida de las cadenas de HS. Se ha atribuido una gran importancia biológica a las cadenas de HS en casi los tipos de tejidos estudiados, pero no se encontraron fenotipos clínicos extra-esqueléticos debidos a mutaciones

heterocigotas en los genes *EXT1* ó *EXT2* en pacientes con osteocondromatosis múltiple hereditaria (Jones, 2011).

### **13. Tratamiento**

Hasta el momento, no existen tratamientos específicos y la extirpación quirúrgica del tumor es necesaria en caso de molestias (compresiones vasculares o nerviosas, falta de movimiento articular, etc.) o dolores ocasionados por los mismos. Esta práctica es muy difícil de realizar cuando el osteocondroma se encuentra sobre una vértebra o envolviendo a un nervio (Roehl & Pacifici, 2010). Cuando se trata de una lesión solitaria y asintomática no se recomienda la cirugía para extirparla si no presenta molestias o dolor (Kitsoulis et al., 2008). Suelen usarse para la prevención, técnicas de liberación de la inclinación del ligamento carpal colateral del cúbito en la muñeca, y como tratamiento, para el impedimento ó la dislocación completa de la cabeza radial, la resección de la cabeza del radio durante la maduración esquelética. También se están aplicando intervenciones de crecimiento guiado, como tratamiento para manejar las desviaciones de la muñeca generadas por el sobrepeso radial (Jones, 2011). Además, los tratamientos correctivos de las deformidades óseas causadas por esta patología, consisten en la extirpación quirúrgica de una parte de hueso, adjuntando posteriormente un fijador externo que aumente gradualmente el espacio entre los dos extremos de los huesos y conduciendo así a un alargamiento y enderezamiento del mismo (Roehl & Pacifici, 2010). El manejo terapéutico de la malignización a condrosarcoma se realiza por medio de una resección quirúrgica con la extirpación de márgenes de tejido mixomatoso o parte de la cubierta cartilaginosa. La quimioterapia y radioterapia son las opciones terapéuticas de elección para tumores indiferenciados (Kitsoulis et al., 2008).

Diferentes grupos de investigación se encuentran evaluando posibles opciones terapéuticas relacionadas a la inhibición de las alteraciones de los mecanismos de señalización generados por defectos en las cadenas de HSPG. Una de las estrategias que se están investigando es la inhibición de la señal de IHH para impedir el crecimiento tumoral y para mejorar la diferenciación de los condrocitos y disminuir la agresividad de los condrosarcomas (Bové, 2010). En el caso de los condrosarcomas de bajo grado, son manejados quirúrgicamente, ya que son localmente agresivos y no producen metástasis. En el caso de condrosarcomas de alto grado, producen metástasis y son letales en la mayoría de los pacientes, la quimioterapia y radioterapia son ineficaces en este caso ya que las células tumorales son resistentes a estos agentes

farmacológicos (Bové, 2010). Se ha utilizado un tratamiento con un agente bloqueante de *hedgehog*, "triparanol", que ha producido una disminución en la tasa de proliferación, celularidad y volumen del tumor en condrosarcomas humanos, cultivos de órganos in vitro y en injertos realizados en ratones. Una droga derivada de la planta *Veratum californicum*, la "ciclopamina" está siendo investigada para utilizarse como tratamiento de neoplasias de cartílago, ya que es un inhibidor de *Hedgehog* que ha sido probada en ovejas, causando mínimos efectos adversos pero presenta efectos teratogénicos cuando es utilizada durante la preñez. Por este motivo están siendo desarrolladas terapias con ciclopamina para el uso en pacientes con condrosarcomas que actualmente son eficaces para el tratamiento de cáncer de piel y cerebro. (Alman, 2009; Bové & Hogendoorn, 2010; Rubin & de Sauvage, 2006). Se han identificado diferentes perfiles de expresión génica que podrían utilizarse como potenciales blancos terapéuticos para los condrosarcomas periféricos. Algunas posibles terapias propuestas estarían dadas por la inhibición de la expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2) o de metaloproteinasas, ya que como estas enzimas se activan en la matriz extracelular de los condrosarcomas, su inhibición podría atenuar la capacidad invasiva de las células tumorales (Bové & Hogendoorn, 2010). Una futura aplicación clínica en evaluación, es el agregado de geles que contienen GAGs en sitios de escisión quirúrgicos de osteocondromas para restablecer la capacidad de diferenciación de los condrocitos (Jones, 2011).

## **HIPÓTESIS**

El estudio de variables clínicas, bioquímicas y alteraciones genéticas en pacientes latinoamericanos con la patología ósea osteocondromatosis múltiple hereditaria (EXT1/EXT2-CDG), contribuirá al diagnóstico diferencial respecto a otras patologías óseas de similar afectación clínica, a su caracterización genotípica y a la asociación del grado de severidad del fenotipo con respecto al espectro de mutaciones causantes de la enfermedad.

# ***OBJETIVOS***

## **OBJETIVO GENERAL**

Se espera profundizar en el conocimiento de las bases clínicas, bioquímicas y moleculares de la patología ósea osteocondromatosis múltiple hereditaria (EXT1/EXT2-CDG) en pacientes latinoamericanos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **PARTE A**

a) Analizar las variables clínicas-radiológicas para caracterización de la severidad clínica del fenotipo, en los pacientes con osteocondromatosis incorporados al estudio.

b) Estandarizar e implementar la metodología para la búsqueda de mutaciones en los genes *EXT1* y *EXT2*.

b.1) Búsqueda de mutaciones mediante la metodología de amplificación por PCR y secuenciación directa.

b.2) Ensayos de amplificación con sondas *multiplex ligation dependent probe amplification* (MLPA), para la detección de deleciones o duplicaciones de gran tamaño y/o rearrreglos medianos en ambos genes.

b.3) Analizar pérdida de heterocigocidad (*LOH*) en ADN extraído de tejidos de osteocondromas y condrosarcomas de pacientes con osteocondromatosis.

c) Inferir el efecto patogénico por análisis *in silico* de mutaciones no descritas anteriormente.

### **PARTE B**

d) Estudiar la expresión de las proteínas exostosina 1 y exostosina 2 en tejido de osteocondromas y condrosarcomas.

d.1) Obtención de fracciones microsomales por subfraccionamiento celular.

d.2) Analizar la expresión de las proteínas exostosina 1 y exostosina 2 en las fracciones microsomales obtenidas.

e) Determinar el grado de asociación entre las variables clínicas analizadas y los cambios genéticos detectados

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## **MATERIALES**

**1. Población de estudio e individuos controles:**En este estudio han sido incluidos 33 pacientes y familiares directos cuando fue posible la extracción, representados por 19 pacientes de sexo masculino y 14 de sexo femenino, no relacionados. Los pacientes fueron derivados desde el Servicio de Traumatología, de la Unidad de Tumores Músculo-Esqueléticos de la Provincia de Córdoba, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad (Córdoba, Argentina). Para la validación de las mutaciones *missense* no descritas con anterioridad fueron incluidos 50 sujetos controles normales de nuestra población (Córdoba-Argentina), 35 de sexo femenino y 15 de sexo masculino, entre 25 y 60 años de edad.

**2. Criterios de inclusión:**Los pacientes incluidos en este estudio presentaron manifestaciones clínico-radiológicas de osteocondromatosis en rangos de edades que oscilaron entre los 2 a 55 años al momento del diagnóstico clínico.

Los estudios realizados en material biológico (ADN y muestras de tejido) y/o análisis de historias clínicas de cada paciente y sus familiares fueron incorporados a este estudio a partir de la previa aceptación de su participación en este proyecto de tesis doctoral por parte del paciente y mediante la firma de un consentimiento informado de acuerdo a la Declaración de Helsinki del año 2000 con sus modificaciones. Este proyecto de investigación fue evaluado previamente y autorizado por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos para ser realizado como trabajo de investigación asociado al desarrollo de una tesis de doctorado (CIEIS(Acta N° 95/2007).

**3. Criterios de exclusión:**Han sido excluidos del estudio, pacientes que no presenten osteocondromas detectables a nivel clínico o radiológico, pacientes con metacondromatosis que presentan encondromas conjuntamente con osteocondromas, como así también, pacientes con Displasia Epifisiaria Hemimélica (DEH) que presentan lesiones tumorales cartilaginosas localizadas en las epifisis de los huesos tubulares como carpo y metacarpo y no presentan deformidades óseas, en las cuales no están involucradas alteraciones en los genes *EXT* (Boveé et.al., 2006). También fueron excluidos de este estudio, pacientes o familiares que no aceptarán la firma del consentimiento informado para su participación.

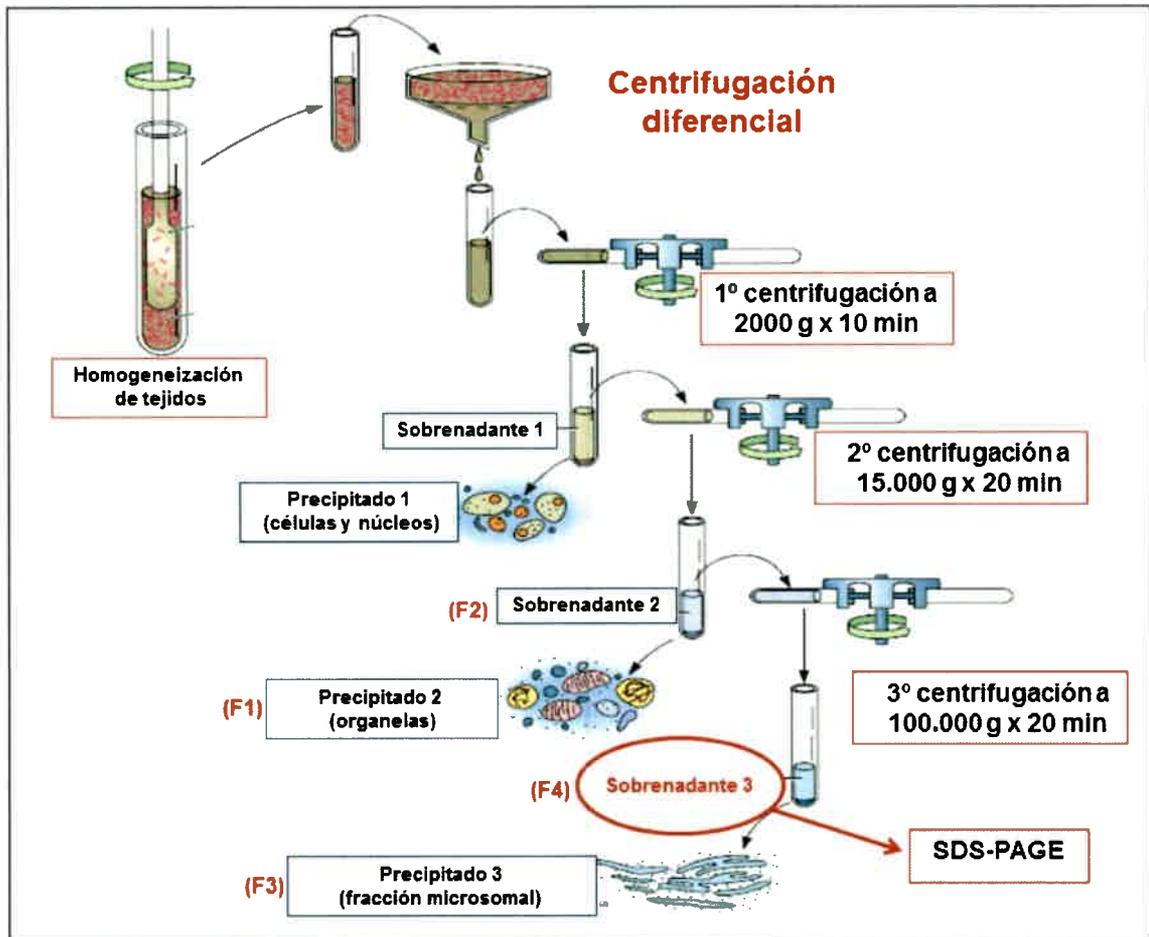
**4. Muestras biológicas:** Muestras de sangre entera fueron extraídas y procesadas para la obtención de ADN genómico, a partir de la fracción leucocitaria de sangre periférica. Para el análisis de las proteínas EXT1 y EXT2 se utilizó tejido de osteocondroma y/o de condrosarcoma, obtenidos a partir de los procedimientos quirúrgicos programados.

**4.1 Preparación de ADN genómico humano:** El ADN genómico (ADNg) se obtuvo a partir de la fracción leucocitaria extraída de 5 ml sangre periférica, en tubos conteniendo 0,5 ml de 0,1 M EDTA o a partir de tejido cartilaginoso tumoral obtenido en cirugías. La extracción de ADNg se llevó a cabo con un *kit* comercial de extracción según las instrucciones del fabricante (*Wizard Genomic Purification Kit, PROMEGA, Madison, WI*). El ADNg fue conservado a -20°C durante el transcurso de este estudio.

**4.2 Subfraccionamiento celular de tejido de cartílago:** Para realizar el análisis del nivel de expresión de las proteínas exostosina 1 y exostosina 2, se aislaron a partir de cartílago, las subfracciones celulares por centrifugación diferencial, partiendo de un homogeneizado del tejido tumoral extraído. Este procedimiento también se realizó en tejidos provenientes de sujetos controles, extraídos en cirugías traumatológicas (controles normales) y en tejido de cartílago afectado en pacientes con osteocondromatosis. Para ello, una fracción del tejido fue procesada mecánicamente en un homogenizador PRO 200 PKG3 con buffer RIPA (*radio immune precipitation assay buffer*) compuesto por Tris-HCl 10mM pH:7,4, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, deoxicolato de sodio 0.5% y Nonident P-40 1%, en condiciones desnaturizantes y en presencia de inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM, leupeptina 10 mM, pepstatina 10 mM y aprotinina 10 mM). El subfraccionamiento subcelular comprendió sucesivas centrifugaciones diferenciales: inicialmente los tejidos homogeneizados se centrifugaron a 600 g durante 10 min a 4°C, posteriormente los sobrenadantes obtenidos fueron centrifugados a 15.000 g x 20 min a 4°C y al sobrenadante obtenido se lo centrifugó a 100.000 g durante 20 minutos. Se obtuvieron las siguientes fracciones: fracción 1 (F1) obtenida del precipitado de la 2<sup>da</sup> centrifugación (precipitado 2) (15.000g x 20 minutos) que contiene organelas (lisosomas, mitocondrias, etc); fracción 2 (F2) correspondiente al sobrenadante de la 2<sup>da</sup> centrifugación (sobrenadante 2); este último sobrenadante, se sometió a una 3<sup>ra</sup> centrifugación obteniéndose la fracción 3 (F3) correspondiente al precipitado de la 3<sup>er</sup> centrifugación (precipitado 3) (15.000g x 20 min) que contiene las fracciones microsomales enriquecidas con membranas celulares y la fracción

4 (F4) correspondiente al sobrenadante de la 3ª centrifugación (sobrenadante 3) que contiene macromoléculas (proteínas) (Figura 12).

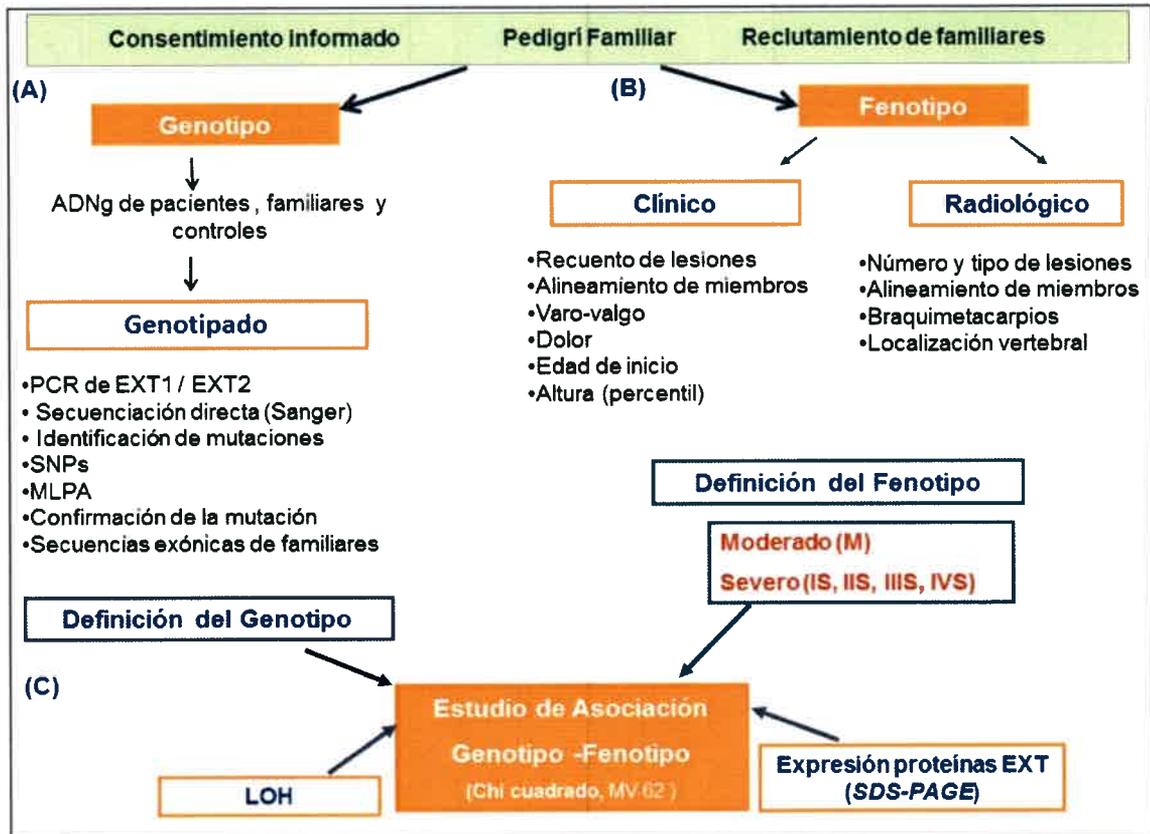
**4.3 Medición de proteínas:** Las proteínas totales fueron cuantificadas usando el método de Lowry (Lowry et al, 1951) y conservadas las fracciones a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.



**Figura 12:** Protocolo de centrifugación diferencial utilizado para la separación de las fracciones subcelulares a partir de tejido de cartílago normal y de tejido de osteocondromas en pacientes con osteocondromatosis. Se realizaron 3 centrifugaciones sucesivas, a  $2000\text{ g} \times 10\text{ min}$  (sobrenadante 1 y precipitado 1), a  $15.000\text{ g} \times 20\text{ min}$  obteniéndose el precipitado 2 (F1) y el sobrenadante 2 (F2), y a  $100.000\text{ g} \times 20\text{ min}$  obteniéndose el precipitado 3 (F3) y el sobrenadante 3 (F4). El sobrenadante 4 fue utilizado para el estudio de expresión de ambas proteínas EXT1 y EXT2, mediante *Western blot*.

Para una mejor comprensión de la metodología utilizada durante este trabajo de tesis, en la Figura 13, se representa un algoritmo de trabajo para el desarrollo de los objetivos planificados para cada una de las etapas de estudio. Estas etapas incluyen los estudios moleculares para detectar la presencia de mutaciones en los genes *EXT1* y *EXT2* (A), el análisis de las variables clínico-radiológicas con determinación del fenotipo y grado de

severidad en el paciente (B) y C) el estudio del nivel de expresión de las proteínas EXT en tejidos de osteocondromas, con posteriormente análisis de asociación entre el genotipo y el fenotipo clínico mediante la prueba estadística Chi-cuadrado MV-62 ( $p < 0,05$ ) (Figura 13)



**Figura 13: Algoritmo implementado para el estudio clínico y molecular de pacientes con osteocondromatosis.** A) El estudio del genotipo se realizó mediante amplificación por PCR y secuenciación directa (Método de Sanger) y por *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA). Posteriormente a la identificación de las mutaciones y polimorfismos (SNPs), se realizó una confirmación de las nuevas sustituciones *missense* y se realizó la búsqueda de las mutaciones en los familiares directos. Se realizaron además otros estudios complementarios en ADN de tejido de osteocondromas (pérdida de Heterocigocidad *LOH*). B) El estudio del fenotipo clínico se realizó mediante el análisis de variables clínicas y radiológicas. C) Para el estudio del nivel de expresión de las proteínas EXT se realizó SDS-PAGE a partir de tejidos de osteocondromas. Posteriormente se realizó un estudio de asociación entre el genotipo y el fenotipo clínico mediante la prueba estadística Chi-cuadrado MV-62 ( $p < 0,05$ ). (Imagen adaptada y modificada de Álvarez et al., 2006).

## **METODOLOGÍA**

### **PARTE A**

#### **4. Análisis de variables clínico-radiológicas**

El diagnóstico clínico fue realizado por profesionales médicos especialistas en traumatología y en base a las manifestaciones fenotípicas de osteocondromatosis que presentaron los pacientes. Se realizaron exámenes físicos y estudios de imágenes (Rayos X, RMN, TAC) en el Servicio de Traumatología y el Servicio de Bioimágenes del Hospital de Niños de la Sma. Trinidad, Universidad Nacional de Córdoba, respectivamente. Las variables clínicas determinadas, fueron analizadas de acuerdo a una escala de valoración establecida por la Sociedad de Tumores Musculo-Esqueléticos con modificaciones (Francannet et al., 2001). Esta escala incluye la evaluación de las lesiones palpables, determinación de la edad de comienzo de la enfermedad y estudio de las deformidades y limitaciones funcionales. Estos parámetros permitieron determinar la calidad de las lesiones y la severidad de la enfermedad, de acuerdo a la edad de inicio de la enfermedad (antes/después de los 3 años de edad), el número de osteocondromas (menor/mayor a 10 osteocondromas), la localización vertebral de los osteocondromas (ausencia/presencia), la estatura (debajo/por encima del 10<sup>mo</sup> percentil) y la tasa funcional (buena ó regular). El recuento de las lesiones involucra a todos los osteocondromas visibles por bioimágenes (mapeos óseos). La morfología de las lesiones incluye el número de osteocondromas sésiles (base de la lesión > cabeza de la lesión) y pedunculados (base de la lesión < cabeza de la lesión). La ubicación de la lesión involucra el recuento del número de lesiones en los huesos planos (Alvarez et al., 2006). Para evaluar la tasa funcional se utilizó una modificación de una escala establecida por la Sociedad de Tumores Musculo-esqueléticos (Francannet et al., 2001). Para evaluar la *Severidad* de la enfermedad se consideran la estatura y el grado o la tasa funcional (Francannet et al., 2001). Esta última está basada en el análisis de cinco variables: la presencia de dolor, y cuatro categorías de deformidades (braquimetacarpios, acortamiento de los antebrazos, varo/valgo de rodilla y acortamiento de las extremidades). Esta última, es clasificada como "regular" cuando por lo menos uno de cinco factores está presente; de otro modo, la tasa funcional es clasificada como "buena" (Tabla 4). Al finalizar el estudio de estas variables, los diferentes grados de severidad se clasifican en: fenotipo moderado (M) ó severo (S). El fenotipo Moderado (M), presenta aparición de síntomas a edad mayor a los 3 años,

número de exostomas menor a 10, sin localización de lesiones vertebrales, estatura mayor al 10º percentil y una tasa funcional buena. El fenotipo Severo (S) está definido por cuatro subgrupos clínicos (desde el tipo IS al tipo IVS) ordenados en orden creciente de severidad (Francannet et al., 2001) (Tabla 5). Para la clasificación de fenotipo severo se considera, la aparición de síntomas entre 0 y 3 años, con un número de osteocondromas no menor a 10 y una tasa funcional regular, aumentando el grado de severidad de acuerdo a la presencia de lesiones con localización vertebral y con una estatura menor al 10º percentil. El subgrupo (IS) es clasificado según la presencia de 10 a 25 osteocondromas, ausencia de localización vertebral y altura del 10º percentil. Dentro del subgrupo (IIS) son incluidos los pacientes por presencia de mayor número de exostomas (>25); en el subgrupo (IIIS) son incluidos aquellos que presentan osteocondromas vertebrales; y por último en el subgrupo (IVS) están comprendidos pacientes que presenten una estatura menor al 3º percentil (Francannet et al., 2001) (Tabla 6).

Tabla 4: Variables clínicas para determinar la tasa funcional en OM (Francannet et al., 2001)

Rating	Dolor	Braquimetacarpios	Acortamiento de hombros (cm)	Varo o valgo de rodilla (grado)	Acortamiento de miembros (cm)
Buena	Nada/moderado	-	Nada /<1	Nada	Nada /1
Regular	Moderado/severo	+	>2	+	>2

Tabla 5: Variables clínicas para determinar la severidad del fenotipo en OM (Francannet et al., 2001)

Fenotipo	Edad de inicio	Nº de exostosis	Localización vertebral	Estatura (percentil)	Tasa funcional
Severo	3 años	10	+	10	Regular
Moderado	>3 años	>10	-	>10	Buena

Tabla 6: Determinación de subtipos de severidad en OM (Francannet et al., 2001)

Tipos	Nº exostosis	Localización vertebral	Estatura (percentil)	Tasa funcional
Tipo IS	<25	-	<10	Regular
Tipo IIS	>25	-	<10	Regular
Tipo IIIS	10-25	+	<10	Regular
Tipo IVS	10-25	-	<3	Regular

## 5. Estudios moleculares

### 5.1 Búsqueda de mutaciones puntuales en los genes *EXT1* y *EXT2*

La extracción de ADNg se llevó a cabo con un kit comercial según las instrucciones del fabricante (*Wizard Genomic Purification Kit, PROMEGA, Madison, WI*), a partir de la fracción leucocitaria de sangre periférica de pacientes con fenotipo compatible y sujetos utilizados como controles normales. Se amplificaron los 11 exones que conforman el gen *EXT1* y los 14 exones del gen *EXT2* incluyendo al menos 50 pb de las regiones intrónicas flanqueantes a cada exón. La metodología de amplificación por PCR y secuenciación directa fue realizada por el método de Sanger (Jennes et al., 2008; Wuyts et al., 1998, 2005) (Sanger et al., 1977). El diseño de las secuencias de los cebadores y las condiciones de reacción de las etapas de PCR han sido descritas en Sarrión et al., 2013. Todos los fragmentos, excepto los correspondientes al exón 1 del gen *EXT1*, se amplificaron simultáneamente con las mismas condiciones de reacción de PCR. El exón 1 del gen *EXT1* y el exón 4 del gen *EXT2* fueron escindidos en varios fragmentos superpuestos para la obtención de productos que no superen las 650 pb. La reacción de PCR fue realizada en un volumen de 50 µl conteniendo ~100 ng de ADN genómico, 1–2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dinucleótido trifosfato (dNTP), 0,4 µM de cada *primer forward* y *reverse* y 0,7 U of *GoTaqR Flexi polimerasa* (Promega, Madison, WI). Los programas de PCR incluyeron una desnaturalización inicial de 4 min at 95°C, seguida por 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a una temperatura de *annealing* (Ta) y 1 min at 72°C, y posteriormente, para una elongación final, se incubó durante 5 min a 72°C durante 5 min. La temperatura de *annealing* fue de 60°C para todas las combinaciones de *primers*, excepto para la amplificación de los fragmentos superpuestos del exón 1 de *EXT1*. Para esas combinaciones de *primers*, la Ta se estableció a 55°C para el fragmento ex1.1 y 57°C para los fragmentos ex1.2 and ex1.3 de *EXT1*. Los productos de PCR amplificados fueron separados mediante electroforesis

en geles de agarosa (1-2%) según el tamaño de los fragmentos y para su visualización se realizó la tinción del ADN con bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron purificados con un kit de purificación de PCR (*IllustraGFX™ PCR, GEHealthcare Lifeciences*) Sarrión et al., 2013. Para la secuenciación de los productos de PCR se utilizó el Kit de secuenciación *Big Dye Terminator Cycle Sequencing v2.0 (Applied biosystems, Carlsbad, CA, USA)* y las secuencias fueron examinadas en un analizador "ABI PRISM 3700 DNA analyzer" (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*) en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona. Los electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación de cada exón, se analizaron con un programa específico (*SeqMan® DNASTAR® Inc., Madison, WI, USA*) para determinar la presencia de mutaciones en los genes estudiados. En la tabla 7 están enumerados los cebadores utilizados para la amplificación de exones y las regiones intrónicas flanqueantes de los genes *EXT1* y *EXT2*. Las mutaciones fueron denominadas según la nomenclatura oficial HGVS ([www.hgvs.org](http://www.hgvs.org)). Se tomaron como secuencias de referencia accesos disponibles en línea en "The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): NM\_000127.2 como secuencia de referencia del *wild type* para el gen *EXT1* y NM\_000401.1 para el gen *EXT2*.

Tabla 7: Cebadores utilizados para amplificar y secuenciar los genes *EXT1* y *EXT2*(Sarrión et al., 2013)

Cebadores	Reverse	Forward
<b><i>EXT1</i></b>		
Exón 1.1	5' tgggaaactgggtgattctt 3'	3' gggatcaattggaaaacgaggattc 5'
Exón 1.2	5' ggcttgacagtttagggcatcgag 3'	3' ttgtccacaagtggagactctg 5'
Exón 1.3	5' ccagttgtcacctcagatgtgc 3'	3' aactcacacctggaccaag 5'
Exón 2	5' tgcgtaaattcatgcacatgg 3'	3' ggттаacattatcacctctcc 5'
Exón 3	5' tgcgtaaattcatgcacatgg 3'	3' ttactttccaacaaaatctcc 5'
Exón 4	5' ctatatgctagaagccaaatgc 3'	3' gattcctgtacttgatattg 5'
Exón 5	5' tcattactctctctgtcttg 3'	3' gtccatcaaacacctgcat 5'
Exón 6	5' cctgtcaggacataagaagc 3'	3' gcctcgtaacacctttca 5'
Exón 7	5' tctgccgtttgtctgtctg 3'	3' gctttgtgacctgtgtgtat 5'
Exón 8	5' gtgaggatgggagaattgtc 3'	3' gtttaacagccccgattcct 5'
Exón 9	5' gaattaatgttccacagtc 3'	3' ctgatgtgcaaagtgtgttt 5'
Exón 10	5' catcatcattatcattaccattc 3'	3' ccaaggatgtaaagctctcc 5'
Exón 11	5' ttgctgcttgctcatttggc 3'	3' cttagatgagcagaatgacaaa 5'
<b><i>EXT2</i></b>		
Exón 4.1	5' tgagtgcacagagtgaaccc 3'	3' caagggtatatactatgctctg 5'
Exón 4.2	5' agccgacagtccecatccc 3'	3' ctctgctcttgagttggttt 5'
Exón 5	5' gttgggattccaggagttgc 3'	3' cctcctgaagatttagaagtg 5'
Exón 6	5' ccgagatgcgtgtataaggc 3'	3' gctgtctaccaagtttctaag 5'
Exón 7	5' tcaagaactgtcccaataag 3'	3' ggtgtctgtgtctgtgcaa 5'
Exón 8	5' agtattgcttggcgtcaacc 3'	3' gagagtttagactggttcta 5'
Exón 9	5' aatggagctgtaagagaactc 3'	3' ggttactcctccactagat 5'
Exón 10	5' tggcttgaacagcaggag 3'	3' cctgataagggcagcataatt 5'
Exón 11	5' caccaagcctgccatgttg 3'	3' cattctgagacagcatgcc 5'
Exón 12	5' accttggatttgatgagagc 3'	3' gtgcgtaagagtgtgggta 5'
Exón 13	5' tctccagaatcccattatgac 3'	3' cacgctcatagtagaaaatag 5'
Exón 14	5' gtcaactgacaaaagcattc 3'	3' ggactagataaactttaagctc 5'
Exón 15	5' cttgtgagttctgccgttg 3'	3' gaatgctactcactcaattgt 5'
Exón 16	5' acctgtcaaccttttaagaac 3'	3' gttgacctactggatcttgg 5'

## 5.2 Análisis *In silico* de mutaciones sin sentido ó missense

Se utilizaron diferentes metodologías *In Silico*: *PolyPhen2*, *ESE-Finder 3.0*, *Mutation Taster* y *Protein Homology Fold Recognition Engine* para evaluar la potencialidad de las mutaciones *missense* detectadas en *EXT1* o *EXT2* para causar enfermedad. Las mutaciones *missense* no descritas en la literatura anteriormente, fueron confirmadas con otro método, realizando digestión del producto de PCR del exón mutado con enzimas de restricción, según el patrón de restricción analizado para cada cambio según el marco de lectura.

El análisis de los patrones de digestión permite diferenciar mutaciones con respecto a polimorfismos genéticos (SNP: del inglés: *Single Nucleotide Polymorphisms*). Los SNPs son descartados cuando el alelo mutado no se encuentre en 100 alelos de ADN<sub>g</sub> de controles normales, confirmándose dicha variante genómica como "mutación".

### 5.2.1 Herramientas bioinformáticas utilizadas en el análisis *in silico*

a) *Polyphen-2 (Polymorphism Phenotyping v2)*, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. Es una herramienta que permite predecir el posible impacto que tendría la sustitución de un aminoácido en la estructura tridimensional y en la función de una proteína humana. La predicción la realiza calculando el impacto, uniendo el análisis de consideraciones físicas y comparativas, ángulos de enlace, tridimensionalidad de la proteína y analizando en relación a otros programas, dominios, zonas y relaciones transmembrana. Esta predicción está basada en un número de características que comprenden: la secuencia, información filogenética y estructural que caracterizan a dicha sustitución (Adzhubei et al., 2010).

b) *ESE Finder 3.0 (ESE: Exonic Splicing Enhancer)* (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>). Se utilizó con la finalidad de predecir sitios de unión a *enhancers de splicing* exónicos (ESE) que son reconocidos por proteínas individuales relacionadas al *splicing* (SR) para identificar sitios ESE por un modelo funcional *in vivo* o *in vitro* SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*). Se utiliza un minigen que alberga a estas secuencias ESE que se requieren para un *splicing* efectivo del pre-ARNm (Cartegni, 2003; Smith et al., 2006).

c) *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org/>). Es un programa computacional que utiliza un algoritmo Bayesiano para predecir el posible impacto que tendría la alteración genómica en el desarrollo de la enfermedad. El algoritmo Bayesiano calcula las probabilidades que presenta una determinada alteración genómica en producir una mutación causante de la enfermedad o bien un polimorfismo inocuo. Para realizar esta predicción, se estudian las frecuencias de todas las características individuales de enfermedades conocidas producidas por mutaciones y/o polimorfismos en un gran conjunto compuesto por >390.000 mutaciones conocidas de enfermedades y >6.800.000 polimorfismos inocuos y de 1000 polimorfismos producidos por inserciones ó deleciones (Indel) del Proyecto Genoma y se compara con la secuencia de referencia (Schwarz et al., 2010; Desmet et al., 2009).

d) *Protein Homology Fold Recognition Engine (PHYRE2)* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>). Esta herramienta *in silico* permite predecir la estructura tridimensional de una proteína usando los principios y técnicas de modelamiento por homología con secuencias proteicas conocidas. Debido a que las estructuras proteicas se encuentran muy conservadas en la evolución, la secuencia de una proteína de interés puede ser modelada con mucha precisión relacionándola por alineamiento con una secuencia de una proteína de estructura conocida. Este programa

permite escanear la secuencia de aminoácidos de una proteína y alinearla con una base de datos que contiene un gran número de estructuras tridimensionales de secuencias de proteínas conocidas. El alineamiento de las secuencias está basado en el modelo de Markov por medio del cual, captura la tendencia que produciría la mutación en cada posición de la secuencia de aminoácidos, basándose en observaciones en secuencias proteicas relacionadas (Karplus et al., 1998). Como resultado produce patrones entre estructuras secundarias que logran predecir la estructura tridimensional de una proteína (Kelley & Sternberg, 2009).

### 5.2.2. Análisis enzimático de restricción

Se utilizaron diferentes enzimas de restricción específicas de acuerdo al mapa de restricción analizado para cada secuencia mutada y fueron estudiados 100 alelos de controles normales para poder descartar la posibilidad que sean polimorfismos proteicos propios de la población estudiada.

### 5.3 Análisis *in silico* de mutaciones intrónicas

Las herramientas *in silico* utilizadas, permiten predecir si una mutación intrónica afecta a un sitio de *splicing* alterando de esta manera el corte de intrones y el empalme de exones. Se analizaron los cambios con las siguientes dos herramientas computacionales: *Human Splice Finder* (<http://www.umd.be/HSF/>) y *NetGene2* (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface?jobid=netgene2>).

a) *Human Splice Finder* (<http://www.umd.be/HSF/>). Este programa bioinformático contiene matrices disponibles para la predicción de secuencias exónicas e intrónicas y para sitios de *splicing* regulatorios de genes humanos. Para calcular los valores consenso de potenciales sitios de *splicing* esta herramienta presenta algoritmos que permiten identificar los sitios de unión con proteínas regulatorias del *splicing*, integrando las proteínas regulatorias del programa ESEFinder conjuntamente con las proteínas 9G8, Tra2-beta, hnRNP A1 ribonucleoproteína que conforman el spliceosoma. También presenta matrices de posición que permiten valorar la fuerza de los extremos 5' y 3' para generar el *splicing*. Mediante una comparación directa de la mutación o polimorfismo del gen de referencia con todos los exones e intrones de la base de datos *Ensembl human genome database* que permite acceder a cualquier secuencia de genes humanos, combinando motivos identificados con diferentes metodologías experimentales y computacionales, se provee una interfase que puede utilizarse para análisis de secuencias. Esta herramienta está siendo ampliamente

utilizada para la asociación de genotipo-fenotipo en *GEN2PHEN European Project* o en el *Human Variome Project*(Desmet et al., 2009).

b) *NetGene2* (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface?jobid=netgene2/>). Este programa bioinformático predice los posibles sitios de *splicing* en ADN de humanos, *C. elegans* y *A. thaliana*. Puede detectar correctamente un sitio donador de *splicing* y predicciones de *splicing* alternativos. Predice el punto de corte los sitios de *splicing* locales mediante reglas basadas en valores de confianza, resultados de predicciones, el contexto codificante y las distancias entre los potenciales sitios de *splicing*(Hebsgaard et al., 1996).

#### **5.4 Estudio de grandes deleciones o rearrreglos medianos en genes *EXT1* y *EXT2***

La dosis ó número de copias de los exones de *EXT1* y *EXT2* presentes en el ADN genómico extraído de leucocitos de sangre periféricaó de tejidos de osteocondromas/condrosarcoma, fue analizada usando la metodología de ensayos de amplificación con sondas dependientes de ligamiento múltiple “*multiplex ligation-dependent probe amplification*” (MLPA). Esta técnica fue diseñada por MRC-Holland (code #P215-B1 *EXT*, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) y se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta metodología permite identificar rearrreglos medianos dentro de un gen, deleciones o duplicaciones de tamaños grandes (incluso de exones enteros), además de determinar la dosis o número de copias presentes en los genes estudiados (*EXT1* y *EXT2*). Para ello se utilizó un kit para el ensayo de MLPA de Service XS mejorado con sondas de dos colores diseñadas para ambos genes(*AL Leiden Service*)(Hameetman et al., 2007; Jennes et al., 2008; Pedrini et al., 2005; Signori et al., 2007; Vink et al., 2005; White & Sterrenburg, 2003).La metodología de MLPA con sondas de dos colores permite la cuantificación relativa de 50 secuencias genómicas diferentes en una simple reacción.

La técnica de MLPA está basada en dos reacciones, la primera consta de la hibridización de las sondas a una zona del ADN homóloga; sólo las sondas que hayan hibridado podrán ser unidas y posteriormente amplificadas por PCR. Para realizar esta reacción, en un mismo tubo se hibridaron las sondas fluorescentes y se unieron combinaciones de dos sondas de oligonucleótidos adyacentes. Posteriormente a la unión, los extremos comunes de las sondas sirvieron como molde para la amplificación en una sola reacción de PCR y fueron separados los productos resultantes según la marcación fluorescente observada(Vink et al., 2005; White & Sterrenburg, 2003).Los productos de PCR fueron secuenciados en un *ABI 3730 DNA Analyzer capillary*

*sequencer* (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). Los picos obtenidos fueron analizados usando un software *Coffalyser v9.4 software* (MRC-Holland Vs 05; 30-08-2007). Esta metodología permite identificar aberraciones en el número de copias genómicas debidas a las diferencias de tamaño entre cada una de las sondas mediante el análisis cuantitativo de los fragmentos obtenidos.

### **5.5 Estudio de Pérdida de Heterocigocidad (LOH)**

Se analizó LOH a partir de ADN extraído de la cubierta de cartílago de tejido de tumores obtenidos mediante cirugías. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante un kit comercial como fue descrito anteriormente para el ADNg. El análisis de las alteraciones moleculares (mutaciones puntuales y/o grandes deleciones o duplicaciones) en el ADN extraído de los tejidos se realizó de la misma manera que fue descrito para el análisis del ADNg según lo descrito en materiales y métodos (Bovée et al., 1999; Raskind et al., 1995).

## **PARTE B**

### **6. Estudio de expresión de las proteínas exostosina 1 y exostosina 2**

#### **6.1 Separación de proteínas por SDS-PAGE y detección por Western blot**

Para el análisis del nivel de expresión de las proteínas exostosina 1 y exostosina 2, se utilizaron las fracciones subcelulares obtenidas mediante un protocolo de centrifugación diferencial según lo enunciado anteriormente.

La expresión de ambas proteínas fue analizada en la fracción soluble F4. Se utilizaron 20 µg de proteínas resuspendidas en buffer de siembra 5 X (TTM 5X, 1.25M Tris-Cl, SDS 25%, DTT 0.5% (pH:6.8), Glicerol 5%, Azul de bromofenol 0.5%) con agregado de inhibidores de proteasas (PMSF 100 mM, leupeptina 10 mM, pepstatina 10 mM y aprotinina 10mM). Posteriormente las proteínas resuspendidas fueron separadas en geles discontinuos de acrilamida-SDS al 10%, (SDS-PAGE) durante 2 horas a 20-40V. Para el análisis por *Western blot* las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*) durante 1 hora a 240 mA e incubadas posteriormente las membranas con anticuerpos policlonales de conejo *full-length* anti-exostosina 1 y anti-exostosina 2 humanas (H00002131-D01P y H00002132-D01P *Abnova, Taiwan, China*) dilución 1:500. La detección quimioluminiscente se realizó a partir de la incubación con un anticuerpo secundario *anti rabbit-IgG* (1:2500 *BioRad*

USA) conjugado con peroxidasa y revelado con ECL (*Enhanced chemiluminescence*, GE Healthcare Lifeciences, UK) (Bernard et al., 2001; Trebicz-Geffen et al., 2008).

### **7. Cuantificación de niveles de expresión de ambas proteínas**

Las imágenes de las bandas observadas por *Western blot* con los anticuerpos específicos, fueron analizadas por densitometría arbitraria mediante la utilización de un programa para procesamiento de imágenes de dominio público (*Image J*, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Las bandas correspondientes al peso molecular de ~74 KD para la proteína EXT1 y ~73KD para la proteína EXT2, fueron analizadas en separaciones de proteínas de controles normales y de pacientes con osteocondromatosis (OM y OS) analizados.

### **8. Análisis estadístico**

Las variables analizadas fueron descritas mediante sus valores medios/promedios, rangos/desvío estándar (DE) para las variables cuantitativas, y en frecuencias absolutas y relativas expresadas en porcentajes para las variables cualitativas. La comparación entre los valores de la detección proteica en tejido de exostosis 1 y 2 y las variables cuantitativas, como edad y tiempo de evolución de la enfermedad, se realizaron mediante prueba de Kruskal-Wallis. La evaluación de la asociación entre variables cualitativas como herencia, fenotipo, entre otras, se realizó mediante la prueba Chi-cuadrado MV-62. En todos los casos el punto crítico para significación estadística fue fijado en  $p < 0,05$ .

# ***RESULTADOS***

## PARTE A

### **1. *Análisis y registro en base de datos de las variables clínico-radiológicas estudiadas***

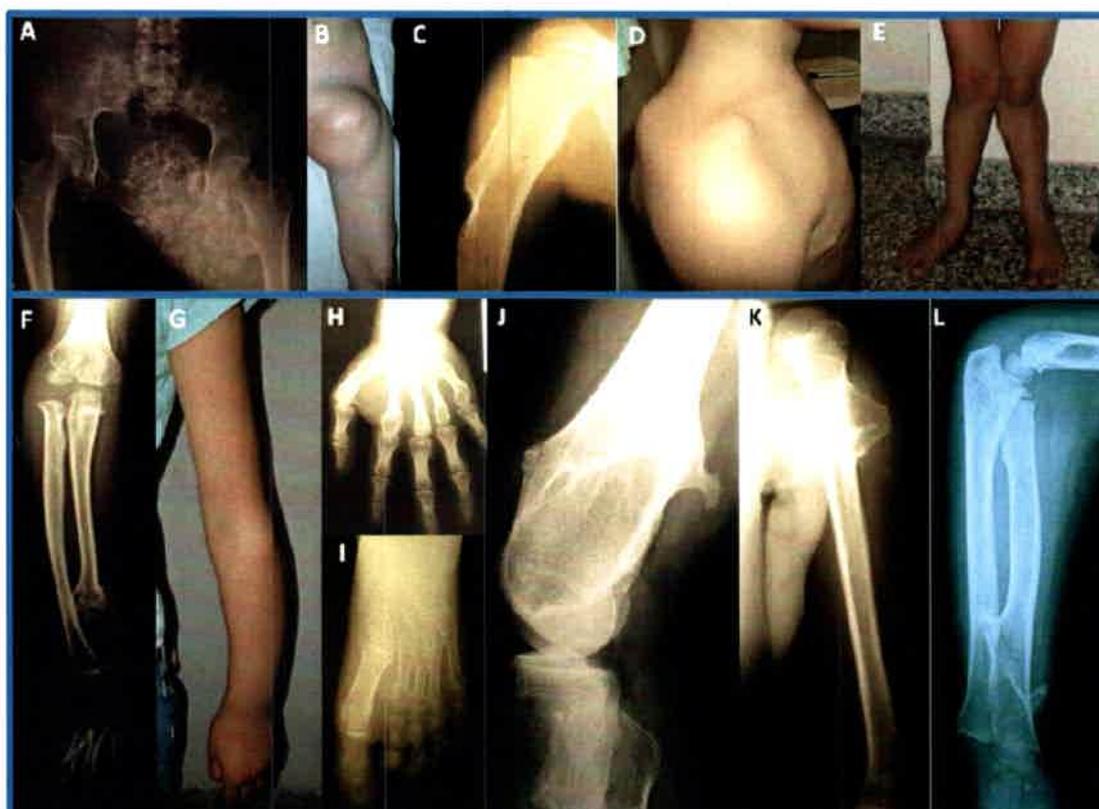
#### **1.1 *Ingreso de pacientes al estudio***

Se procedió al análisis y registro de variables clínico-radiológicas de pacientes EXT1/EXT2-CDG. Para ello, fueron ingresados al estudio 33 pacientes como casos índices, 19 de sexo masculino y 14 de sexo femenino, y se estudiaron familiares directos de los mismos, solo cuando era posible su incorporación. Los pacientes provenían del Servicio de Traumatología, y de la Unidad de Tumores Músculo Esqueléticos de la Provincia de Córdoba, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba. Igualmente, otros pacientes ingresaron desde otros países Latinoamericanos. Los pacientes provenían con definición clínico-radiológica de osteocondromatosis múltiple o solitaria y sus rangos de edades oscilaron entre los 2 a 55 años al momento del diagnóstico clínico. Cada paciente fue ingresado al estudio a partir de su aceptación de participación mediante la firma de consentimiento informado (Acta N° 95, aprobación del acta e inicio del proyecto 10 de Marzo de 2008). Los pacientes fueron ingresados al estudio y anonimizados sus datos personales, siendo designados con numeración correlativa según el orden de registro con la letra "P" seguida del número de ingreso correspondiente, por ej., P01, P02, etc.

#### **1.2 *Estudio de variables clínico-radiológicas para la determinación del fenotipo clínico***

De los 33 pacientes analizados, el 82% presentó osteocondromatosis múltiple (n=27) y un 18% osteocondromatosis solitaria (n=6). A partir del análisis de las variables clínicas determinadas, se establecieron diferentes fenotipos clínicos y grados de severidad de los mismos. En los pacientes con OMse realizaron exámenes clínicos y estudios radiológicos (mapeos óseos) para la apreciación cualitativa y cuantitativa de: a) calidad de las lesiones b) alineamiento de miembros y c) longitud de los segmentos de los miembros. Se evaluó la funcionalidad respecto a la afectación, mediante la valoración en una escala establecida por la Sociedad de Tumores Músculo-esqueléticos (Alvarez et al., 2006; Francannet et al., 2001), según cuatro categorías clasificadas según la presencia de braquimetacarpios, inclinación del antebrazo, acortamiento de antebrazos, varo o valgo, angulación de rodillas, y acortamiento de miembros, como ha sido

descrito en material y métodos. Las manifestaciones clínicas que se observaron más frecuentemente fueron deformidades ortopédicas, acortamiento de extremidades, varo o valgo de rodillas, presencia de braquimetacarpios, escoliosis, sinostosis, artritis y compresión de nervios y vasos sanguíneos (Figura 14).

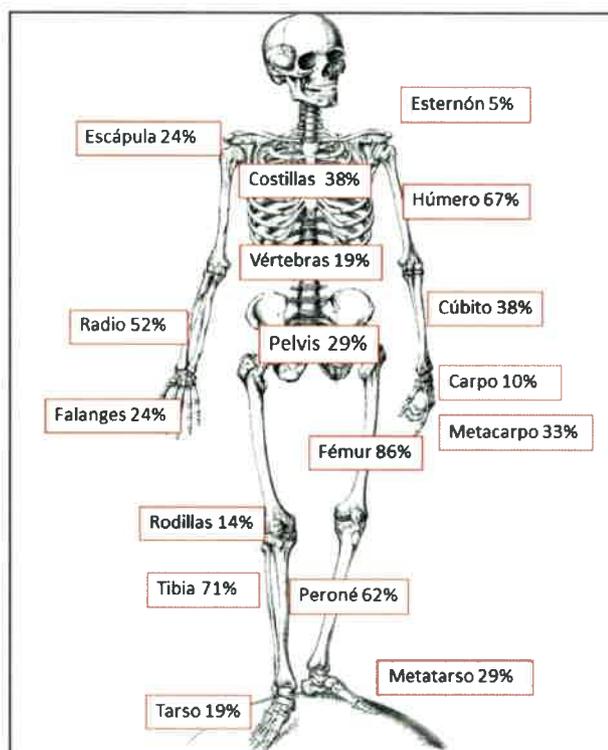


**Figura 14: Imágenes de fotografías y rayos X de lesiones en pacientes OM.** (A) y (B) condrosarcoma en pelvis y fémur proximal en P06, (C) osteocondroma en húmero en P05, (D) osteocondroma escapular en P41, (E) deformidad de los miembros inferiores en P28, (F) fractura en radio en P14, (G) acortamiento y deformidad de radio y muñeca deformada en P30, (H) osteocondromas en metacarpo in P17, (I) braquimetacarpios en P15, (J) osteocondroma pedunculado en fémur en P38, (K) osteocondromas sésiles en P13, (L) sinostosis de radio y muñeca en P16.

### 1.2.1 Localización de lesiones en pacientes con osteocondromatosis múltiple

La evaluación clínica-radiológica sólo pudo ser completada en el 78% de los pacientes con OM (n=21). En este grupo, las lesiones se encontraron localizadas principalmente en fémur 86% (n=18) y en tibia 71% (n=15). El resto de lesiones se presentaron en húmero 67% (n=14), en peroné 62% (n=13), en radio 52% (n=11), en cúbito y costillas 38% (n=8), metacarpo 33% (n=7), metatarso 29% (n=6), y en pelvis 29% (n=6). Si bien el número de osteocondromas en pelvis no es significativo, es en esta localización donde se describe transformación maligna a condrosarcoma en la mayoría de los

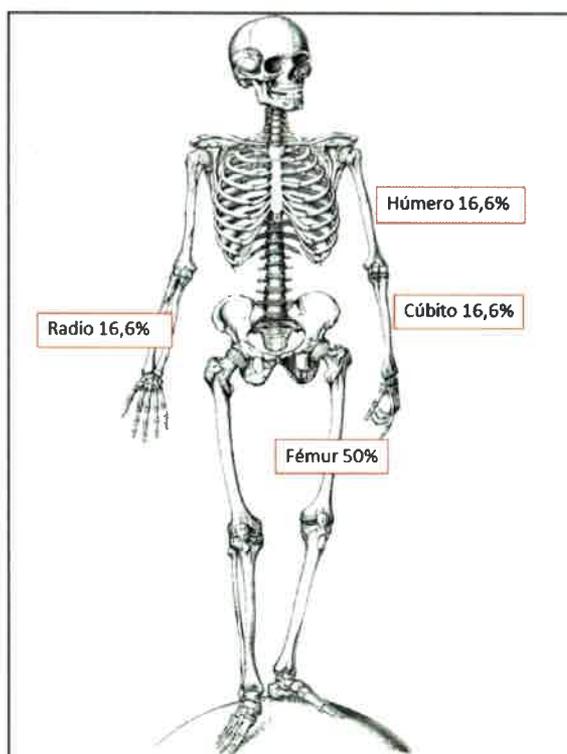
pacientes reportados en la bibliografía y fue lo observado en dos de los pacientes incluidos en este estudio (P06 y P38). En un menor porcentaje se presentaron lesiones en escápula y falanges 24% (n=5), tarso y vértebras 19% (n=4), rodillas 14% (n=3), carpo 10% (n=2) y esternón 5% (n=1) (Figura 15).



**Figura 15: Localización de osteocondromas en pacientes OM.** Gráfico que indica la diferente localización de las lesiones (osteocondromas) respecto a los porcentajes analizados en los pacientes con OM con fenotipo estudiado (n=24).

### 1.2.2 Localización de lesiones en pacientes con osteocondromatosis solitaria

Con respecto a los pacientes con presentación solitaria (n=6), en 50% de los pacientes las lesiones estuvieron localizadas principalmente en el fémur (n=3), mientras que el resto de las lesiones solitarias se distribuyeron en un mismo porcentaje entre cúbito, 16,6% (n=1), húmero 16,6% (n=1), y radio 16,6% (n=1) (Figura 16).

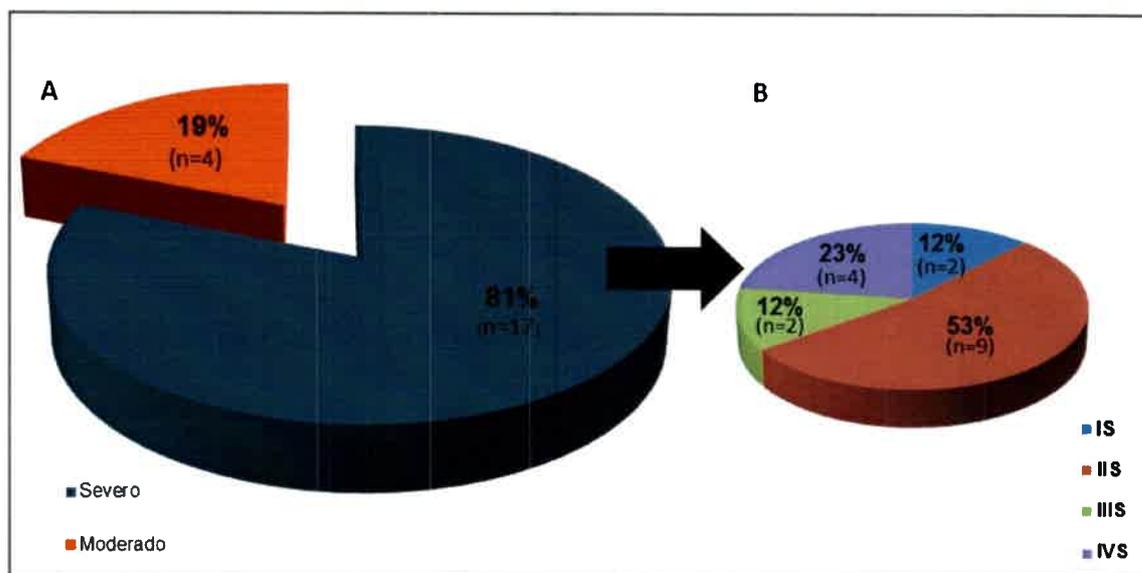


**Figura 16: Osteocondromas en pacientes con OS.** Gráfico que indica la diferente localización de los osteocondromas en los pacientes con lesiones solitarias analizados en este estudio (n=6).

### **1.2.3 Determinación del grado de severidad del fenotipo en pacientes con osteocondromatosis múltiple**

A partir de la determinación del fenotipo en los pacientes OM (n=21) (sólo en aquellos en los cuales pudo completarse el análisis clínico-radiológico), se determinó el grado de severidad. La mayoría de los pacientes OM presentó un fenotipo severo (81% de los pacientes OM) (n=17), mientras que 4 pacientes presentaron fenotipo moderado (grupo M) (19% de los pacientes OM) (Tabla 9, Figura 17A).

Los pacientes con OM y fenotipo severo (n=17), se clasificaron según los siguientes subgrupos: (IS) de 10 a 25 exostosis, no vertebrales y una altura del 10º percentil (12%, n=2); (IIS) número de osteocondromas mayor a 25 (>25) (53%, n=9); (IIIS) presencia de osteocondromas vertebrales (12%, n=2); (IVS) muy baja estatura (menor al 3º percentil) (23%, n=4) (Tabla 6), (Figura 17B).



**Figura 17: Gráfico que indica el fenotipo clínico y el grado de severidad en OM.** (A) Gráfico que indica la proporción de pacientes con fenotipo severo (azul), moderado (rojo) (B) Gráfico donde se observa el grado de severidad del fenotipo en pacientes con presentación severa: IS celeste, IIS rosa, IIIS verde y IVS violeta (n=21).

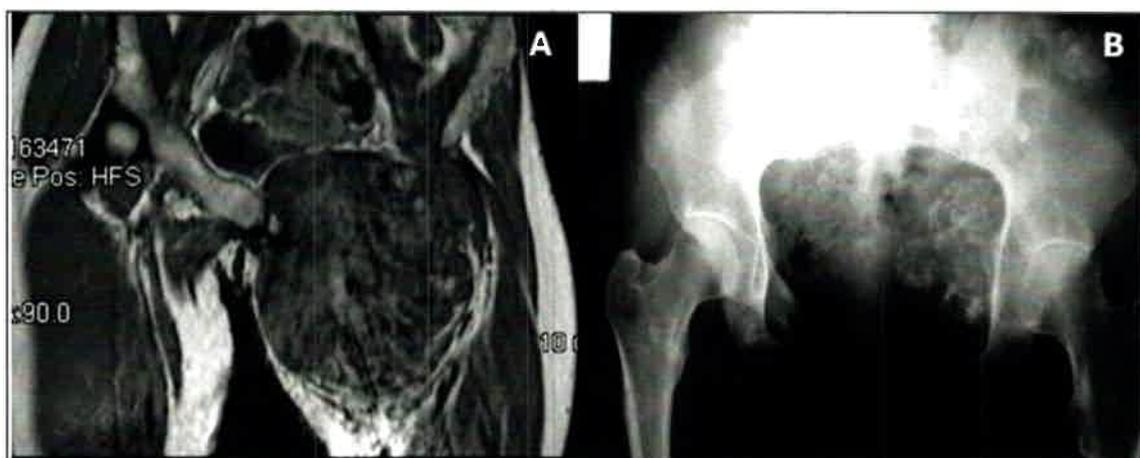
El 70% de los pacientes con OM presentaron una edad temprana de inicio de la enfermedad, la cual fue menor o igual a los 5 años y 48% manifestaron herencia familiar de la patología. En el caso de los pacientes con presentación solitaria, un 67% (n=6) presentó inicio de los síntomas clínicos a edades mayores de 5 años (Tabla 9).

#### 1.2.4 Fenotipo clínico en pacientes con transformación maligna a condrosarcoma

Dos pacientes con OM presentaron osteocondromas en con transformación maligna a condrosarcoma. El paciente P06 de sexo femenino y 32 años de edad, presentó un fenotipo severo con grado IVS y el paciente P38, de sexo masculino y de 42 años de edad, un fenotipo severo con grado IIS. En ambos pacientes la malignización de estas lesiones en pelvis presentó complicaciones como compresiones vasculares y de los órganos del sistema digestivo y reproductor (Tabla 9)(Delgado et al., 2012).La P06presentó el inicio de la enfermedad a la edad de 12 años, y a los 26 años de edad, a su ingreso al servicio de Traumatología e Imágenes del Hospital de Niños de la Sma. Trinidad de Córdoba, fue identificada la transformación maligna de un osteocondroma sésil de la región ileo-púbica izquierda en un condrosarcoma. La paciente presentó 28 lesiones: osteocondromas externos e internos en ambos húmeros, distales en ambos radios, uno proximal en cúbito con sinostosis derecha, distal en ambos fémures, proximal en ambas tibias. En pelvis presentó una formación expansiva en la hemipelvis izquierda, ubicada en el agujero obturador, ingresando a la cavidad pelviana, desplazando el recto, vagina, útero en sentido lateral ocupando el 50% del volumen de

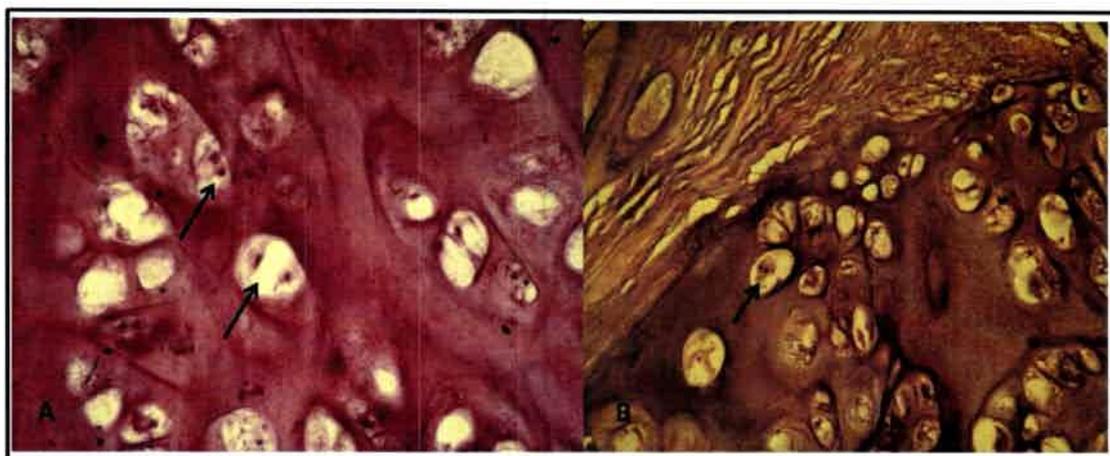
la pelvis. También se observó una deformidad cutánea en todos los músculos del triángulo de Scarpa, progresando en músculos aductores, músculo vasto interno y recto anterior. Otra de las manifestaciones observadas, fueron formaciones extrapélvicas posteriores detrás del cuello del fémur. Dichas características se correspondieron con un condrosarcoma que comprometió totalmente la rama ilio-púbica desde sínfisis hasta el tercio medio de la columna anterior del acetábulo.

En la figura 18 podemos observar las imágenes obtenidas por Tomografía Axial Computada (TAC) en la paciente P06, mediante la cual se confirmó la presencia de una señal heterogénea de una masa ilio-púbica izquierda que comprometía la pelvis con una extensión intrapélvica y fractura de la rama isquio-púbica derecha (Figura 18).



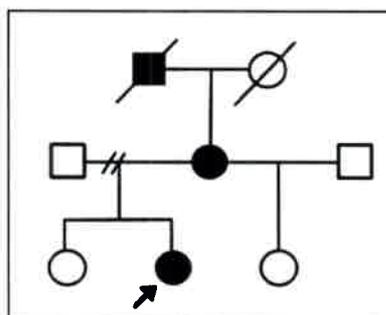
**Figura 18: Imágenes radiológicas obtenidas de un osteocondroma de pelvis malignizado.**(A) Imagen de Tomografía axial computada de pelvis de la paciente P06. (B) Imagen de rayos X de un osteocondroma de pelvis ubicado en el hueso ileopúbico izquierdo demostraron una masa invasiva con una señal heterogénea compatible con un condrosarcoma.(Extraído de Delgado et al., 2012).

El condrosarcoma pélvico en P06 fue reseccionado quirúrgicamente 3 veces procurando dejar margen marginal. Sin embargo en todas las oportunidades, presentó recidiva en el sitio del crecimiento del tumor a corto plazo sin presentar metástasis. En las 3 cirugías, se conservó material de la lesión y se realizó el estudio histológico que resultó en un condrosarcoma de grado I (Figura 19). La evaluación anatómo-patológica del tejido extraído del tumor de pelvis de la paciente demostró la presencia de un neoplasma mesenquimático con producción de matriz cartilaginosa e infiltración de las islas cartilaginosas con tejido óseo subyacente que demuestra un perfil de invasión expansiva (Figura 19 A y B)(Delgado et al., 2012).



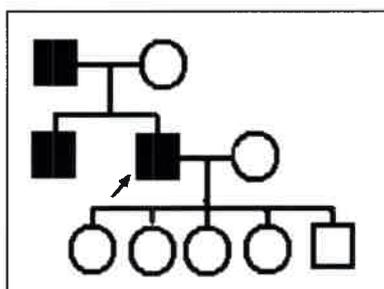
**Figura 19: Imágenes de microscopía óptica de tejido extraído de condrosarcoma.** El análisis anátomo-patológico del tejido extraído del tumor de pelvis demostró una producción de matriz cartilaginosa formando masas lobuladas expansivas en crecimiento. Se pueden evidenciar condrocitos atípicos con sus núcleos agrandados y ocasional binucleación (señalada con las flechas), sin formación osteoide. Estos hallazgos corresponden a un condrosarcoma de grado 1 (A) imagen obtenida con H/E y una resolución de 40x, (B) imagen obtenida con H/E y una resolución de 100 x). (Imágenes extraídas de Delgado et al., 2012).

El análisis del fenotipo de la paciente se ha asociado al grado severo (IVS) basado en un inicio de la enfermedad a una edad >3 años, percentil de altura <3, número de osteocondromas >25, y una tasa funcional “regular” a causa de presentar dolor severo y presencia de varo/valgo en sus extremidades inferiores y lesiones con localización vertebral. En la figura 20 podemos observar el gráfico correspondiente al pedigrí de familia de la paciente P06. Se observa que tanto la madre como el abuelo materno de la paciente, presentaron OM, sin transformación maligna (Figura 20). Con respecto a la madre, de 53 años de edad, presentó >25 lesiones y el análisis del fenotipo clínico reveló la misma tasa funcional que en la paciente “tasa funcional regular”, definida por la presencia de varo/valgo y dolor producido por un osteocondroma, pero con una presentación menos severa (IIS) con respecto a la paciente P06. Esta diferencia pudiera ser debido a que la madre presentó mayor estatura (percentil <10) y ausencia de lesiones vertebrales.



**Figura 20: Diagrama del pedigrí de la familia de P06.** La paciente está señalada con una flecha, y los demás miembros de la familia indicados con círculos (sexo femenino) y cuadrados negros (sexo masculino). Los miembros afectados se indican con las figuras llenas en el interior.

El P38 de sexo masculino y 41 años de edad, al momento de la consulta, presentó antecedentes de osteocondromatosis múltiple con comienzo de síntomas a los 10 años. Se determinó el grado de severidad de las manifestaciones clínicas, el cual ha sido caracterizado como severo (IIS), debido principalmente al número de osteocondromas (>10). Este paciente presentó tumoraciones en ambas rodillas y una transformación maligna a condrosarcoma de un osteocondroma en la hemipelvis derecha, desde el ala ilíaca interna hacia el espacio retroperitoneal. Posterior a la primera intervención quirúrgica, presentó recidiva tumoral a los tres años de la cirugía de resección. Acompañando la tumoración re-emergente se registraron además, manifestaciones en el miembro inferior derecho como edema desde la raíz de muslo con lesiones eritematosas y ampollares, pulso periférico y motilidad activa disminuida y celulitis como producto de una infección. De acuerdo a la entrevista clínica se encontraron miembros de la familia afectados con osteocondromatosis múltiple, su padre y su hermano mayor como se muestra en el pedigrí de la figura 21 (Figura 21).



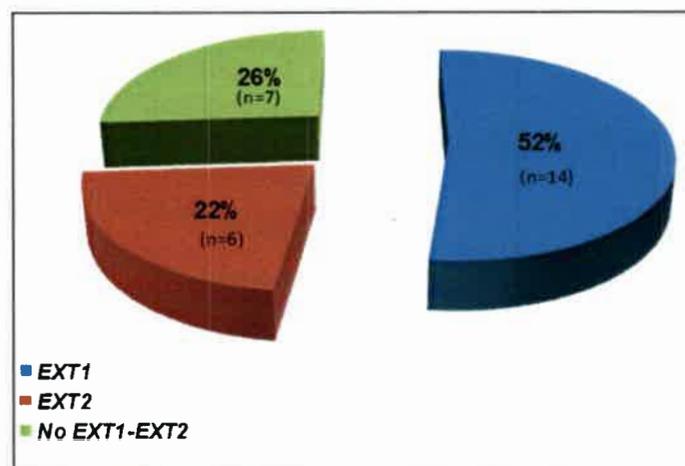
**Figura 21: Diagrama del pedigrí del paciente P38.** Paciente señalado con una flecha, y los demás miembros de la familia indicados con círculos (sexo femenino) y cuadrados negros (sexo masculino). Los miembros afectados se indican con las figuras llenas en el interior.

## 2. Búsqueda de mutaciones en los genes *EXT1* y *EXT2*

### 2.1 Análisis mediante amplificación por PCR y secuenciación directa

Se realizó el análisis molecular de los genes *EXT1* y *EXT2* en los 33 pacientes que presentaron OM úOS. En muestras de ADN genómico se realizó amplificación por PCR y secuenciación directa de los exones por el método de Sanger, incluyendo las regiones intrónicas flanqueantes a cada exón. Posteriormente, se determinó el perfil de MLPA en muestras de ADN de aquellos pacientes en los cuales no había sido posible detectar mutaciones mediante el análisis de PCR y secuenciación directa de ambos genes. En los pacientes que presentaron osteocondromatosis múltiple (n=27), se identificaron mutaciones en un 74% (n=20) de los mismos, de los cuales el 85% (n=17) fueron detectadas por PCR y secuenciación directa, siendo el 15% restante (n=3) detectadas mediante la metodología de MLPA (Tabla 8).

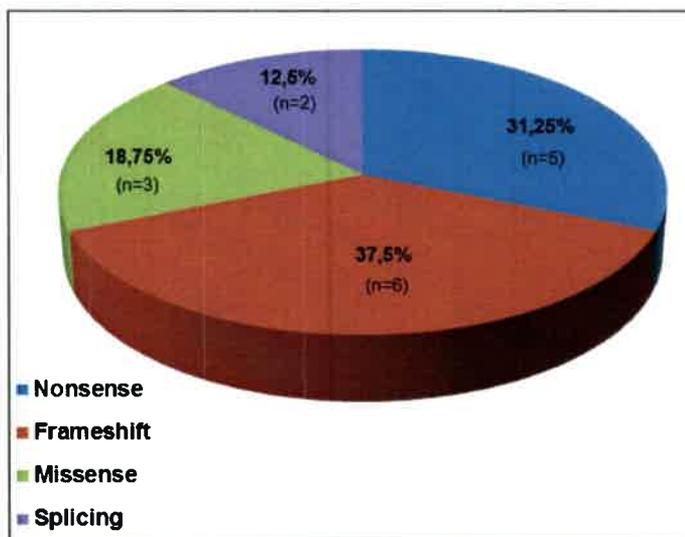
La distribución de las mutaciones en los genes *EXT1-EXT2*, en pacientes con osteocondromatosis múltiple (n=27), correspondieron a: 14 mutaciones en el gen *EXT1* (52%) y 6 mutaciones en el gen *EXT2* (22%). En 7 pacientes con OM no se encontraron mutaciones en las secuencias analizadas para estos genes (26%) (Figura 22).



**Figura 22: Frecuencias absolutas y relativas de las mutaciones en los genes *EXT1* y *EXT2* en OM.** Gráfico que muestra las proporciones de mutaciones puntuales y deleciones grandes encontradas en los genes *EXT1* (azul), *EXT2* (rojo) y con ausencia de mutaciones en ambos genes (No *EXT1-EXT2*) (verde) en los pacientes con osteocondromatosis múltiple analizados en este estudio (n=27).

Las mutaciones puntuales detectadas (*nonsense*, *missense*, pequeñas inserciones y/o deleciones que producen *frameshift* y/o pudieran estar ubicadas en sitios de *splicing*) corresponden a mutaciones *nonsense* (n=5) (29%), mutaciones *missense* (n=3) (18%), mutaciones que producen corrimiento del marco de lectura o “*frameshift*” (n=6) (35%), y mutaciones localizadas en sitios de *splicing* (n=3) (18%). De los alelos

mutantes encontrados, seis de las mutaciones que se hallaron en el gen *EXT1* fueron nuevas (p.Val78Glyfs\*111, p.Leu264Pro, p.Lys306\*, p.Arg346Thr, c.1164+1C>A, p.Gln407\*) y tres de las mutaciones detectadas en el gen *EXT2* (p.Asp307Valfs\*45, p.Trp394\*, p.Asp539Glnfs\*5) (Tabla 8) (Figura 23).



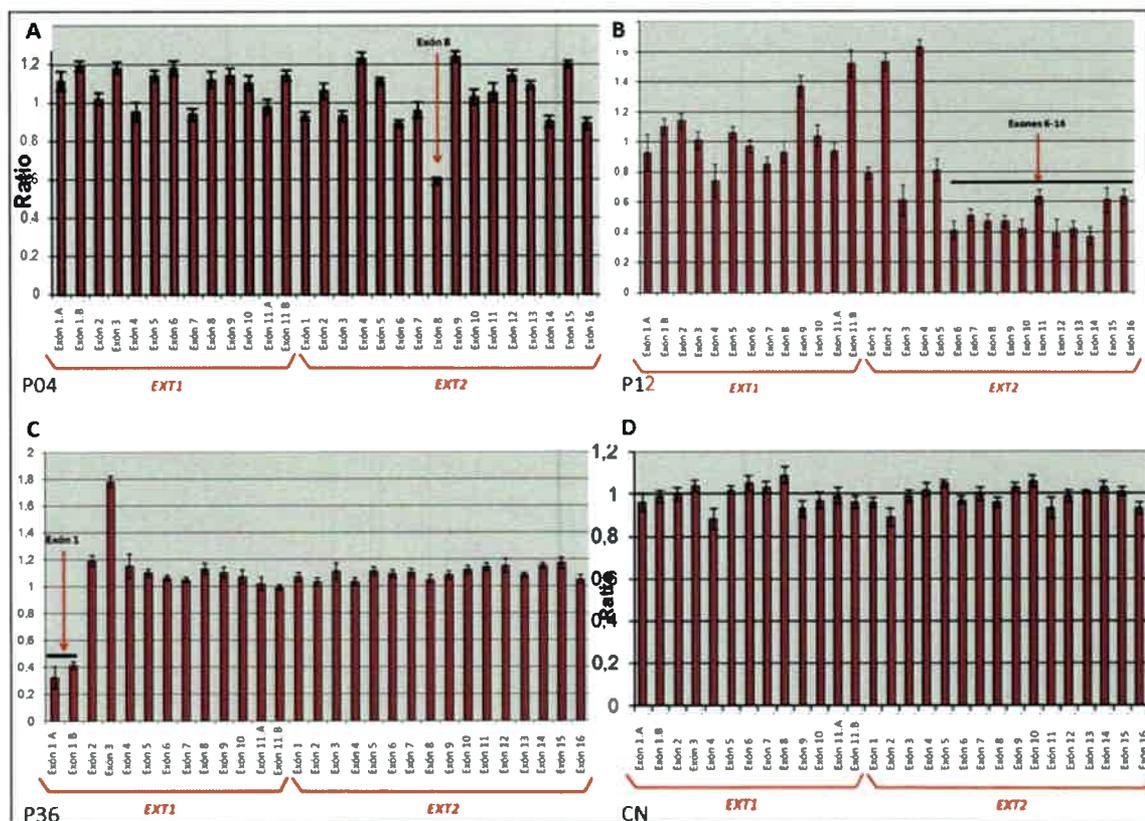
**Figura 23:** Frecuencia absoluta y relativa del tipo de mutaciones puntuales en OM. Gráfico que indica las proporciones de las mutaciones *nonsense* (azul), *frameshift* (rojo), *missense* (verde) y que afectan al sitio de *splicing* (violeta) en los pacientes con osteocondromatosis múltiple analizados en este estudio (n=17).

En su conjunto las mutaciones encontradas en el gen *EXT1* (n=14) estuvieron representadas por: 4 mutaciones *nonsense*, 4 mutaciones que producen corrimiento del marco de lectura o "*frameshift*", 3 mutaciones *missense*, 2 mutaciones localizadas en sitios de *splicing* y un sólo paciente presentó una delección grande. Con respecto a las mutaciones localizadas en el gen *EXT2* (n=6) se clasificaron en: 1 mutación *nonsense*, 2 mutaciones que producen corrimiento del marco de lectura o "*frameshift*", se observó 1 mutación ubicada en sitios de *splicing* y 2 delecciones grandes.

## **2.2 Ensayos de amplificación con sondas MLPA (Multiplex ligation dependent probe amplification)**

Para la detección de posibles delecciones o duplicaciones de gran tamaño y/o rearrreglos medianos dentro de un gen se utilizó la metodología de MLPA como se describió anteriormente en materiales y métodos. Para realizar la cuantificación se calculó la proporción relativa del área de los picos correspondientes a cada exón con respecto al promedio del área de los picos obtenidos de todos los exones de *EXT1* y *EXT2* de cada muestra, y fueron comparadas a su vez con el promedio del área de todos los picos obtenidos de al menos a 10 muestras de ADN de controles normales. Dosis normales

fueron consideradas cuando las muestras presentaron proporciones de área de los picos entre 0,6 (hasta un 40% inferior al promedio del área de los picos de los controles normales) y 1,3 (hasta un 30% superior al promedio del área de los picos de los controles normales). En cambio, fueron consideradas grandes deleciones heterocigotas cuando las muestras contenían la mitad de la dosis, presentando proporciones del área de los picos menores a 0,6 (aproximadamente entre un 35-50% inferior al promedio del área de los picos de los controles normales). Utilizando esta metodología se detectaron tres grandes deleciones en el grupo de pacientes estudiados (16%). Las deleciones observadas correspondieron a pérdidas de uno o varios exones completos. En P36 se encontró una deleción completa del exón 1 del gen *EXT1*, no descrita anteriormente y en P04 fue observada una deleción completa del exón 8 en el gen *EXT2* (Figura 24 A y B). En P12 fue detectada una deleción de 11 exones (6-16) en el gen *EXT2* la cual no había sido descrita anteriormente (Figura 24 C) (Tabla 8).



**Figura 24: Perfiles de MLPA con grandes deleciones en *EXT1* y *EXT2*.** Gráfico de barras que indica en el eje Y los valores correspondientes a las dosis cuantificadas para cada exón de los genes *EXT1* y *EXT2*. Representados en el eje X los valores entre 0,6 y 1 se corresponden a la dosis completa (dos copias), y valores menores a 0,6 se corresponden a la mitad de la dosis (una sola copia). (A) Se señala la deleción completa del exón 8 del gen *EXT2* en P04. (B) Determinación de la deleción completa de los exones 6 al 16 de *EXT2* en P12. (C) Detección de la deleción completa del exón 1 del gen *EXT1* en P36. (D) Perfil de MLPA en un control normal.

Tabla 8: Mutaciones encontradas en los genes *EXT1* ó *EXT2*

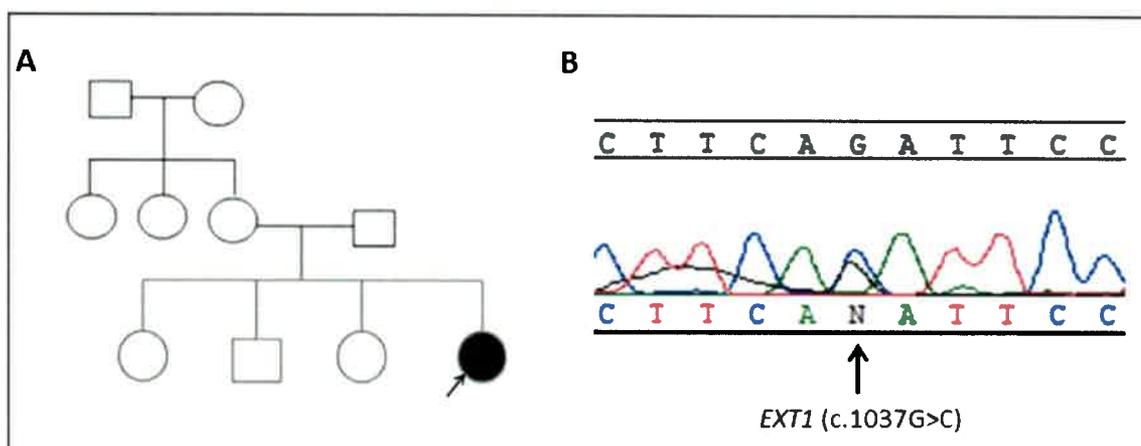
Gen	Paciente	Exon-Intron	Cambio en el cDNA	Cambio en la proteína	Tipo de mutación
<i>EXT1</i>	P37	Ex 1	c.248_249insA,	p.Gln84Alafs*105	Frameshift
<i>EXT1</i>	P15	Ex 1	<b>c.232dupG</b>	p.Val78Glyfs*111	Frameshift
<i>EXT1</i>	P14	Ex 1	c.369_370delAG	p.Lys126Asnfs*62	Frameshift
<i>EXT1</i>	P05	Ex 1	c.752delT	p.Leu251*	Nonsense
<i>EXT1</i>	P17	Ex 1	<b>c.791T&gt;C</b>	p.Leu264Pro	Missense
<i>EXT1</i>	P06 <sup>1</sup>	Ex 1	c.848T>A	p.Leu283*	Nonsense
<i>EXT1</i>	P16	Ex 1	<b>c.916A&gt;T</b>	p.Lys306*	Nonsense
<i>EXT1</i>	P36	Ex1	<b>ex1 del</b>	Desconocida	Delección
<i>EXT1</i>	P40	Ex 2	c.1018C>T	p.Arg340Cys	Missense
<i>EXT1</i>	P08	Ex 2	<b>c.1037G&gt;C</b>	p.Arg346Thr	Missense
<i>EXT1</i>	P28	In 3-4	<b>c.1164 + 1G&gt;A</b>	--	Splicing
<i>EXT1</i>	P41	Ex 4	<b>c.1219C&gt;T</b>	p.Gln407*	Nonsense
<i>EXT1</i>	P02	Ex 6	c.1469delT	p.Leu490Argfs*9	Frameshift
<i>EXT1</i>	P29	In 8-9	c.1722+1G>A	--	Splicing
<i>EXT2</i>	P19	In 5-6	c.626+1G>A	--	Splicing
<i>EXT2</i>	P13	Ex 7	<b>c.920_929del10insTG</b>	p.Asp307Valfs*45	Frameshift
<i>EXT2</i>	P04	Ex 8	ex8 del	Desconocida	Delección
<i>EXT2</i>	P01	Ex 10	<b>c.1182G&gt;A</b>	p.Trp394*	Nonsense
<i>EXT2</i>	P27	Ex 12	<b>c.1616_1623del8ins10</b>	p.Asp539Glnfs*5	Frameshift
<i>EXT2</i>	P12	Ex6-16	<b>ex6-16del</b>	Desconocida	Delección

### 2.3 Validación de mutaciones missense por análisis de restricción

Los cambios debidos a mutaciones *missense* detectados en *EXT1* o *EXT2* y no descritas anteriormente en la bibliografía, fueron validados por medio de la digestión con enzimas de restricción específicas, comparando los perfiles obtenidos con 100 alelos normales de nuestra población. Posteriormente fueron analizados mediante diferentes programas bioinformáticos (*in silico*) el posible efecto patogénico de los cambios encontrados. La patogenicidad de las mutaciones *missense* encontradas (**p.Arg346Thr** en P08 y **p.Leu264Pro** en P17) fueron evaluadas mediante las predicciones de tres herramientas bioinformáticas: *PolyPhen2*, *ESE-Finder 3.0* y *Mutation Taster*. Mediante modelamiento 3-D, se analizó el efecto del cambio observado debido a las mutaciones *missense* utilizando la herramienta *in silico*; *Phyre2*.

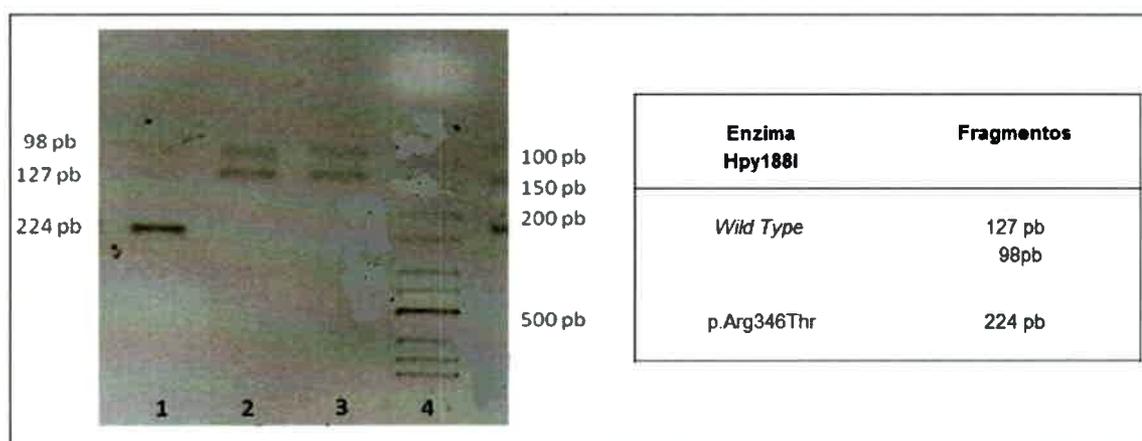
#### 2.3.1. Mutación p.Arg346Thr

Mediante el análisis de la secuencia del exón 2 del gen *EXT1* en P08, se determinó la presencia del cambio del nucleótido guanina por citosina en la posición 1037. Este cambio produciría que el aminoácido arginina (Arg) fuera remplazado por treonina (Thr) en la posición 346 de la proteína exostosina 1. En la figura 25 se observa el pedigree correspondiente a la familia de P08 (figura 25 A), y la imagen de electroferograma de la secuencia que lleva la mutación en el exón 2 de *EXT1*, donde la flecha indica la mutación detectada en el paciente P08 (figura 25 B).



**Figura 25: Imágenes del pedigrí y de la secuencia mutada en P08.** (A) La paciente está señalada con una flecha, y los demás miembros de la familia indicados con círculos (sexo femenino) y cuadrados negros (sexo masculino), (B) Imagen del electroferograma que muestra la secuencia de *EXT1* exón 2 señalándola mutación del paciente P08. Los miembros afectados se indican con las figuras llenas en el interior.

La mutación p.Arg346Thr fue confirmada por digestión con la enzima de restricción *Hpy118I* a partir del análisis de 100 alelos normales. La sustitución de guanina por citosina en la posición 1037 en el gen *EXT1*, produce la formación de la diana para la enzima de restricción *Hpy118I*, escindiendo la secuencia del alelo *wild type* en dos fragmentos: de 127 pb y de 98 pb, respectivamente, mientras la secuencia del alelo mutado no es digerido por la enzima, quedando un fragmento de 224 pb (Figura 26).

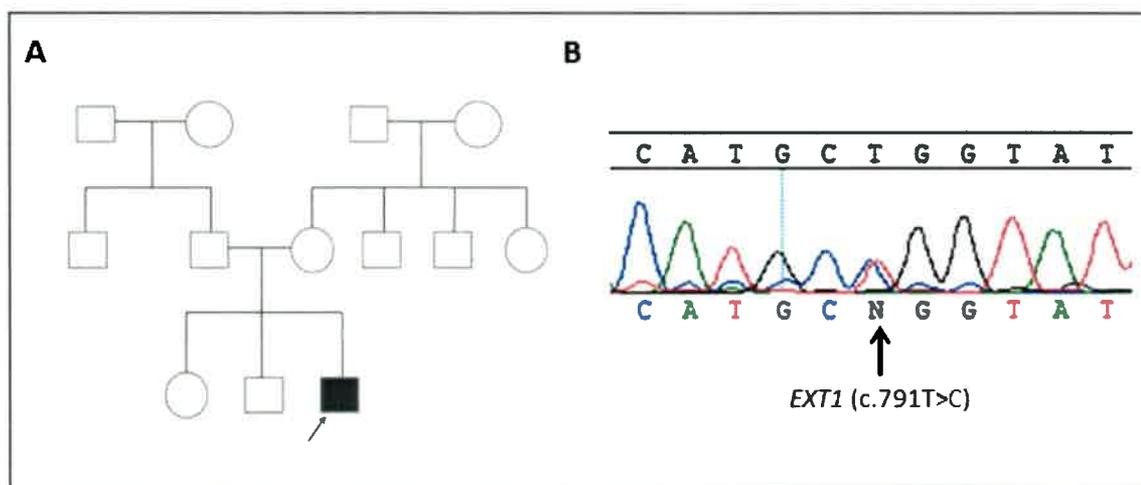


**Figura 26: Imagen de digestiones con la enzima de restricción *Hpy188I*.** (1) Paciente P08, se observa una banda de 224 pb (alelo mutado que no es digerido) y bandas inferiores correspondientes a la digestión del alelo normal, (2) bandas de 127 pb y 98 pb respectivamente correspondientes a alelo normal de la madre del paciente P08, (3) banda de 125 pb y otra de 86 pb de un control normal y (4) marcador de pb.

### 2.3.2. Mutación p.Leu264Pro

Mediante el análisis de la secuencia del exón 1 del gen *EXT1* en P17, se determinó un cambio del nucleótido timina en la posición 791 por citosina, lo cuál produciría el cambio

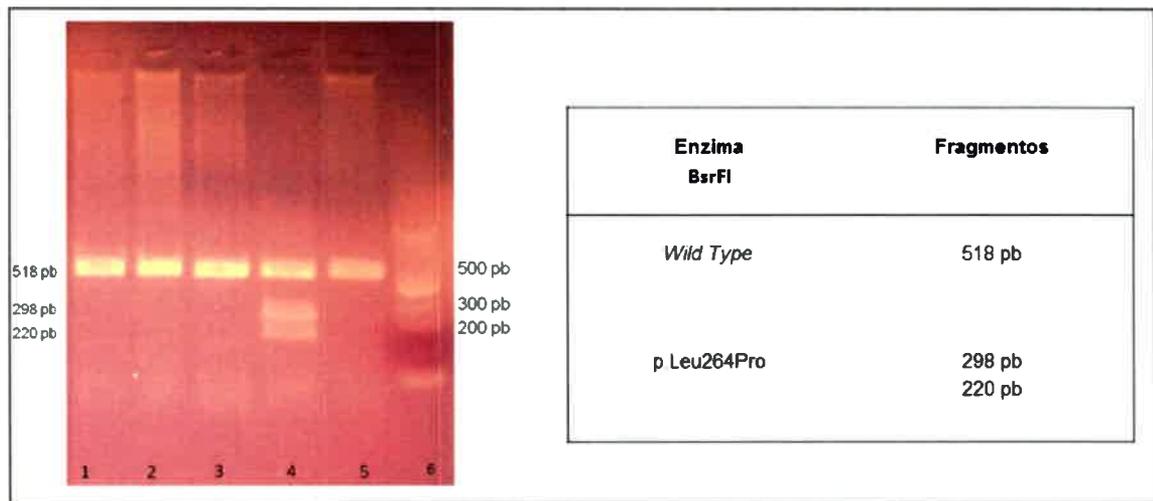
de un aminoácido leucina (Leu) por prolina (Pro) en la posición 264 de la proteína EXT1. En la figura 28 se observa el pedigrí correspondiente a la familia de P17 (figura 27 A), y la imagen del electroferograma con parte de la secuencia del exón 1 de *EXT1*, donde se indica la mutación detectada en el paciente P17 (flecha)(Figura 27 B).



**Figura 27: Imágenes del pedigrí y de la secuencia mutada en P17.** (A) Imagen del pedigrí de la familia del paciente 17, el paciente está señalado con una flecha, y los demás miembros de la familia indicados con círculos (sexo femenino) y cuadrados negros (sexo masculino), (B) Imagen del electroferograma que muestra la secuencia del exón 1 de *EXT1* señalando la mutación del paciente P17 (A).

La mutación p.Leu264Pro fue confirmada por digestión con la enzima de restricción *BsrFI* mediante el análisis de 100 alelos de controles normales. La sustitución de timina por citosina, produce la aparición de una diana para la enzima de restricción, quedando un alelo *wild type* de 518 pb, mientras el alelo mutado es cortado en dos fragmentos: de 298 pb y 220 pb (Figura 29).

En la figura 28 se puede observar el patrón de digestión de la secuencia del gen *EXT1* en P17 con la enzima de restricción *BsrFI* para la mutación p.Leu264Pro, en comparación con controles normales.

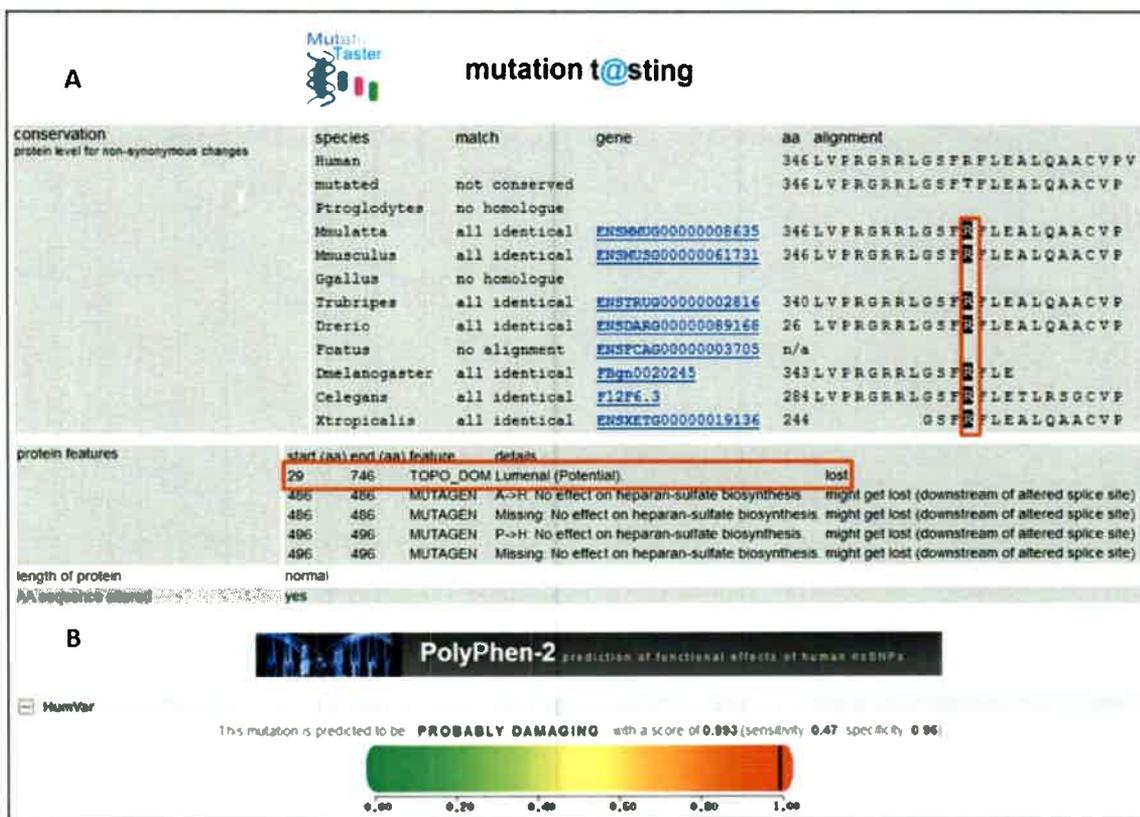


**Figura 28.** Imagen de digestiones con la enzima de restricción *BsrFI*. (1 y 2) Banda de 518 pb correspondiente al alelo *wild type* de 2 controles normales (3) Banda de 518 pb correspondiente al alelo normal del padre del paciente, (4) Paciente P17, se observa una banda de 220 pb y de 298 pb correspondientes al alelo mutado y una banda de 518 pb (alelo normal no digerido), (5) banda de 518 pb correspondiente al alelo normal de la madre del paciente y (6) Marcador de pb.

## 2.4 Análisis *in silico* de mutaciones *missense*

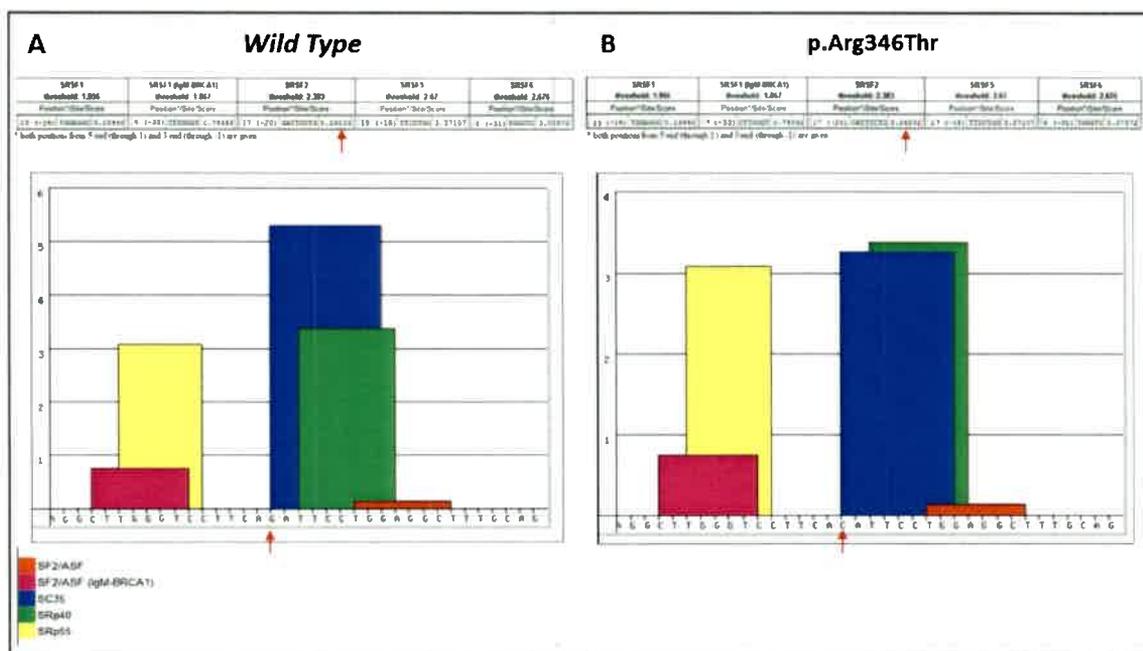
### 2.4.1 Análisis *in silico* de p.Arg346Thr

Según el análisis realizado con herramientas bioinformáticas predictivas, para la mutación *missense* p.Arg346Thr (P08), se observó que el cambio correspondía de un aminoácido básico (Arg) por uno no polar (Thr), por lo cual se predice que presentaría un efecto perjudicial en la proteína EXT1. El análisis de la mutación p.Arg346Thr con *Mutation Taster* ([www.mutationtaster.org/](http://www.mutationtaster.org/); último acceso Marzo de 2014) consideró a la mutación como “causante de la enfermedad” (score 0.999), pudiendo producir afectación en las características de la proteína y/o cambios en un sitio de *splicing*. Además, se predice una pérdida potencial del sitio luminal, siendo la posición 346 de la proteína EXT1 un sitio altamente conservado en varias especies. El análisis bioinformático mediante *PolyPhen2* predijo que la mutación p.Arg346Thr sería “probablemente perjudicial” (*Hum. var. Score*: 0.993, sensibilidad: 0.47; especificidad: 0.96) (Figura 29).



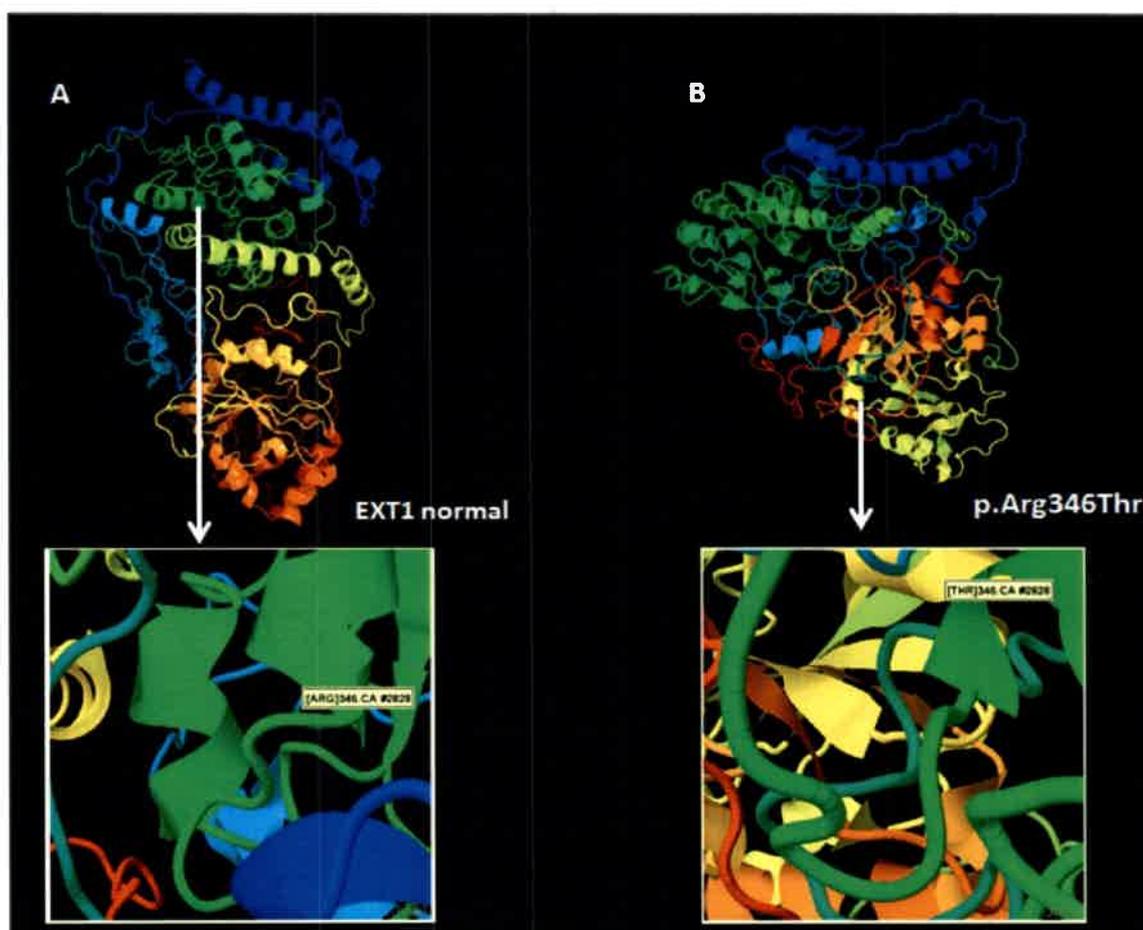
**Figura 29: Análisis bioinformático de predicción de patogenicidad de la mutación *missense* Arg346Thr.** (A) Tabla con los valores obtenidos a partir del análisis con el programa *Mutation Taster*. Se destaca el efecto perjudicial que produciría la mutación en un aminoácido conservado y la pérdida del sitio luminal de la proteína exostosina 1. (B) Gráfico que indica el resultado obtenido mediante análisis bioinformático con el programa *PolyPhen-2* con predicción del daño que produciría la mutación en la proteína exostosina 1.

El programa computacional *ESE Finder 3.0* (último acceso Marzo de 2014), predijo que la mutación p.Arg346Thr produciría niveles disminuidos de una proteína que favorece el *splicing* exónico SRSF2 (SC35). Los niveles de la proteína que favorece el *splicing* SRSF2 (SC35) descienden desde un valor de 5,29 en el alelo *wild type* a un valor de 3,26 en el alelo que presenta la mutación p.Arg346Thr (Figura 30).



**Figura 30: Análisis computacional ESE Finder 3.0 de la mutación p.Arg346Thr para evaluar sitios de *splicing* exónicos del gen *EXT1*.** Gráficos de barras que indican los sitios de secuencias exónicas de unión y las diferentes proporciones de proteínas que intervienen como factores de *splicing*, (A) Análisis para la secuencia del alelo *wild type* y (B) para la secuencia con la mutación (c.1037G>C; p.Arg346Thr). En las tablas superiores se indican con flechas los valores del factor de *splicing* SRSF2 (SC35) (azul). En la parte superior del gráfico de barras las flechas indican el nucleótido normal en el alelo *wild type* (A) y el cambio de nucleótido en el alelo mutado (B).

El análisis bioinformático de la estructura 3-D de la proteína *EXT1* a través del programa *Phyre2* predijo que la mutación p.Arg346Thr produciría la remoción de 2 fragmentos de alfa hélice entre los aminoácidos 345 al 347 y 635 al 639, además de una lámina beta desde los aminoácidos 361 al 368 (Figura 31).



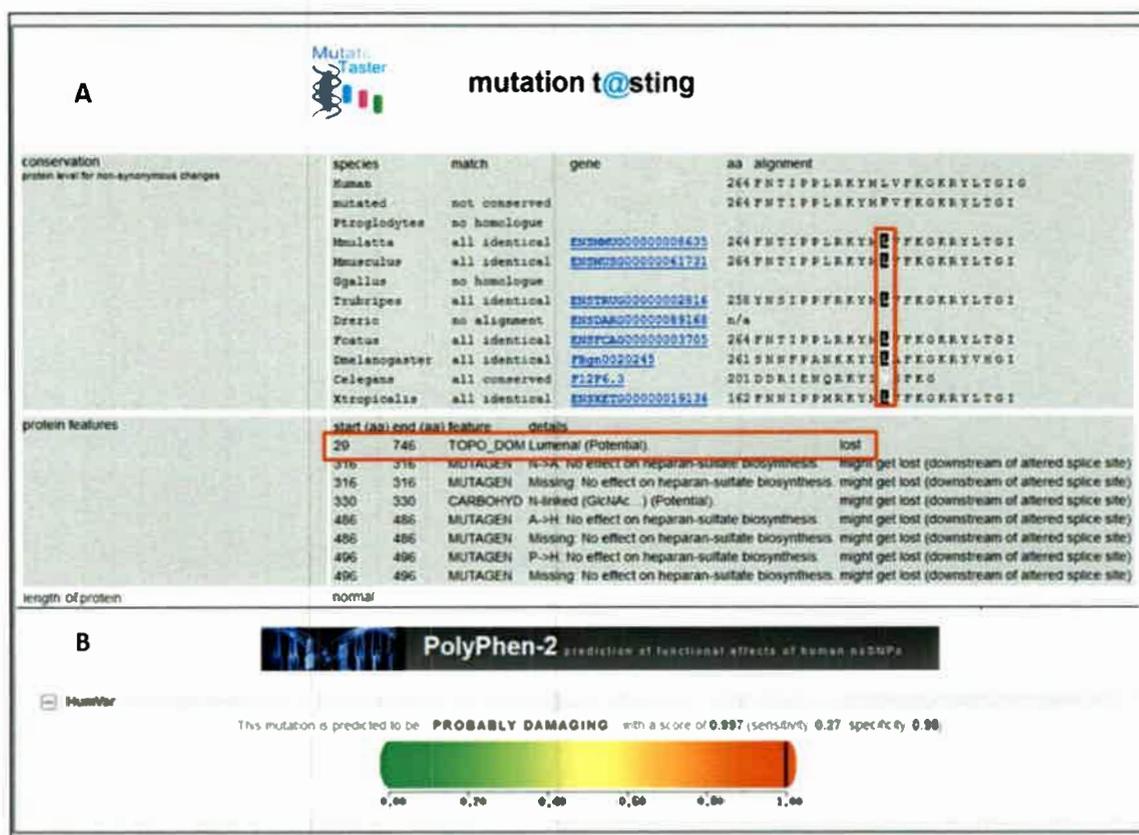
**Figura 31:** Imagen del análisis de la estructura de modelamiento 3-D de la proteína EXT1 generado por *Phyre2* de la mutación p.Arg346Thr. (A) Imagen de la estructura de la proteína EXT1 *wild type*. La flecha indica el dominio afectado por la mutación, se encuentra la imagen inferior ampliada, (B) Imagen predictiva del cambio en la estructura de la proteína EXT1 que produciría la mutación p.Arg346Thr, la flecha indica el dominio afectado por la mutación que se encuentra en la imagen inferior ampliada. El cambio en un dominio alfa hélice (aa 345-353) y el cambio en un segmento de una lámina beta (aa 361 al 368) producirían la alteración en el plegamiento de la proteína EXT1.

Estos resultados en conjunto indican que el cambio de un aminoácido básico (Arg) por uno no polar (Thr) produciría un efecto perjudicial en las características de la proteína EXT1 transformándose muy probablemente en patogénica. Esto es debido a la afectación de un aminoácido altamente conservado en el sitio luminal de la proteína EXT1 que produciría un cambio en la estructura tridimensional de la proteína, como así también generaría un cambio en un sitio de *splicing* exónico.

#### 2.4.2 Análisis *in silico* de p.Leu264Pro

La posible patogenicidad de la mutación p.Leu264Pro se predijo a partir del análisis con diversos programas computacionales. Se observó que el aminoácido apolar (Leu) produciría un efecto perjudicial dentro de la proteína EXT1 que si bien cambia por otro

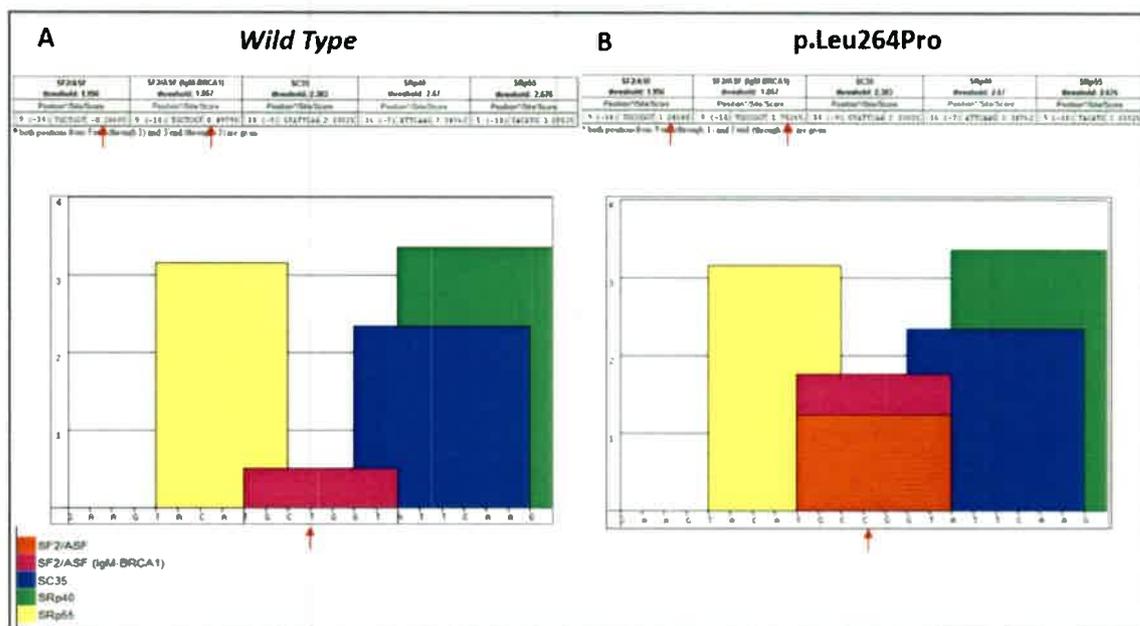
aminoácido también de naturaleza hidrofóbica (Pro), dicho cambio se predice como perjudicial. Mediante el programa bioinformático *Mutation Taster* ([www.mutationtaster.org/](http://www.mutationtaster.org/) último acceso Marzo de 2014) se consideró a la mutación “causante de la enfermedad” (score: 0.999) y generaría un cambio en la secuencia de aminoácidos con afectación de las características de la proteína EXT1. Además, se predijo que la mutación produciría una pérdida potencial del sitio luminal ya que el aminoácido Leu en la posición 264 de la proteína EXT1 se encontraría en un sitio altamente conservado. El análisis mediante la herramienta bioinformática *PolyPhen2* (último acceso Marzo de 2014) predijo a la mutación como “probablemente perjudicial” (Score: 0.997 sensibilidad: 0.27; especificidad: 0.98) (Figura 32).



**Figura 32:** Análisis bioinformático de predicción de la patogenicidad de la mutación *missense* p.Leu264Pro. (A) Tabla con valores obtenidos mediante el programa *Mutation Taster*. Se encuentra remarcado el efecto perjudicial que produciría la mutación en un aminoácido conservado y la pérdida del sitio luminal de la proteína EXT1. (B) Gráfico que indica el resultado obtenido mediante análisis bioinformático con el programa *PolyPhen-2* con predicción del daño que produciría la mutación en la proteína EXT1.

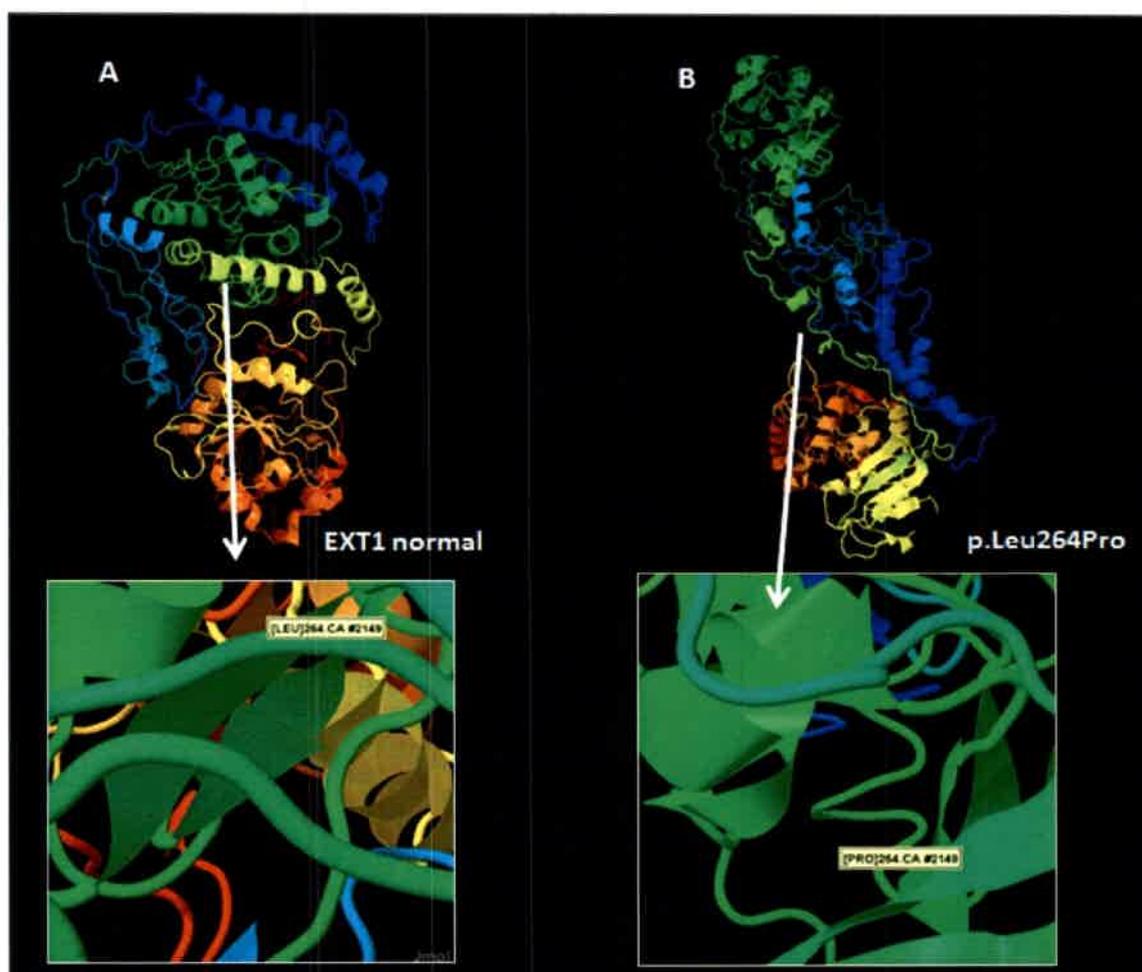
El programa computacional *ESE Finder 3.0* predijo que la mutación p.Leu264Pro podría llegar a producir un aumento de los niveles de las proteínas que favorecen el *splicing* “*Enhancer Splicing Proteins*”. La relación de las proteínas que intervienen en el *splicing*

SF2/ASF cambian desde un valor de -0.21685 en el alelo *wild type*, a un valor de +1.24048 en el alelo que presenta la mutación; y los niveles de la relación entre las proteínas que favorecen el *splicing* SF2/ASF (IgM-BCRA1) aumentarían desde un valor de +0.4979 en el alelo *wild type* a niveles de +1.75265 en el alelo que presenta la mutación (Figura 33).



**Figura 33: Análisis computacional con el programa ESE Finder 3.0 de la mutación p.Leu264Pro para evaluar sitios de *splicing* exónicos del gen EXT1.** Gráfico de barras que indican los sitios de secuencias exónicas de unión y las proporciones de las diferentes de proteínas que intervienen como factores de *splicing* (A) Análisis para la secuencia del alelo *wild type* del gen EXT1 y (B) secuencia con la mutación del P17 (c.791T>C, p.Leu264Pro). En las tablas superiores se indican con flechas los valores del factor de *splicing* SF2/ASF (rojo) y del factor de *splicing* SF2/ASF (IgM-BCRA1) (rosa). En el gráfico de barras las flechas indican (A) el nucleótido normal en el alelo *wild type* y (B) el cambio de nucleótido en el alelo mutado.

El análisis del cambio en la estructura 3-D de la proteína EXT1 debido a la mutación Leu264Pro, mediante el programa *Phyre2* predijo la incorporación de un fragmento alfa hélice entre los aminoácidos 161 al 166 y de un segmento de lamina beta entre el aminoácido 724 al 726. La mutación p.Leu264Pro también produciría la remoción tanto de un segmento alfa hélice desde el aminoácido 344 hasta el 346 y una zona de lámina beta desde el aminoácido 360 hasta el 365 (Figura 34). En La figura 34 se observa la imagen obtenida por el programa computacional *Phyre2* que predice un cambio tridimensional en la estructura de la proteína EXT1 causado por la mutación *missense* p.Leu264Pro.



**Figura 34: Análisis de la estructura de modelamiento 3-D de la proteína EXT1 generado por *Phyre2* de la mutación p.Leu264Pro**(A) Imagen de la estructura de la proteína EXT1 *wild type*. La flecha indica el dominio afectado por la mutación, sitio que se encuentra en la imagen inferior ampliada, (B) Imagen predictiva del cambio en la estructura de la proteína EXT1 que produciría la mutación p.Leu264Pro, la flecha indica el dominio afectado por la mutación que se encuentra en la imagen inferior ampliada, presentando un cambio en un dominio alfa hélice (aa 344-346) y de una zona de lámina beta (aa 360-365) que producirían la alteración en el plegamiento de la proteína EXT1.

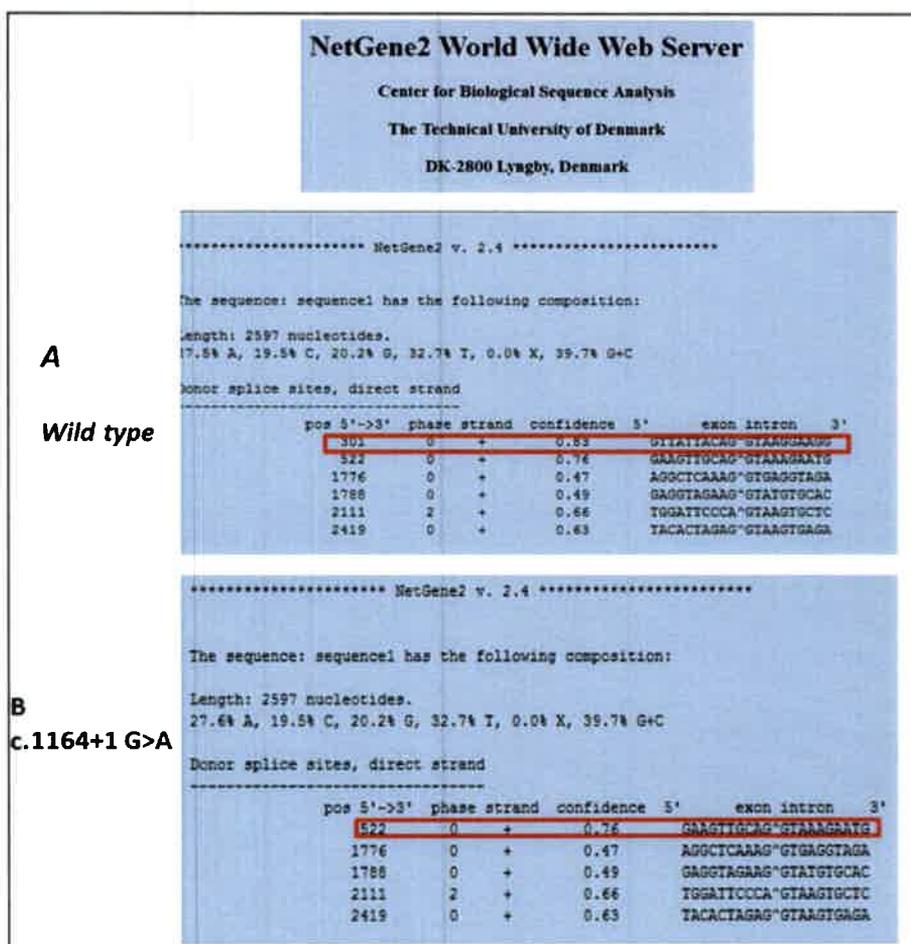
En conjunto estos resultados indican que el cambio de un aminoácido alifático apolar (leucina) por un aminoácido que presenta una función "imino" (prolina), produciría un efecto perjudicial en las características de la proteína exostosina 1 siendo muy probablemente patogénica. La posible patogenicidad sería debido a la afectación en un aminoácido altamente conservado localizado en el sitio luminal de la proteína EXT1 que produciría un cambio en la estructura tridimensional de la proteína y además posiblemente favorecería el *splicing* exónico.

## 2.5 Análisis de mutaciones intrónicas

En el P28 se observó en el gen *EXT1* una mutación intrónica, correspondiente al cambio de adenina en lugar de guanina, en la base siguiente a la que corresponde con la finalización del exón 3 (**c.1164+1 G>A**), la cual no ha sido descrita hasta el momento. Por este motivo, se realizó un análisis *in silico* con el programa específico *HumanSpliceFinder* (<http://www.umd.be/HSF>, último acceso en Marzo de 2014). El análisis bioinformático predijo que esta mutación produciría la aparición de un sitio críptico donador de *splicing* (aaggtcagc) (score: 91.85%) a 83 nucleótidos *downstream* con respecto a la secuencia *wild type* (CAGGtaagg) (score: 98.07%) (Figura 35), mientras que el programa computacional *NetGene2* (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface?jobid=netgene2/>, último acceso en Marzo de 2014) predijo que esta mutación produciría una pérdida en un sitio donador críptico del *splicing* que se encontraba en la secuencia *wild type* (score: 0,83), quedando un nuevo sitio donador de *splicing* a 221 nucleótidos de distancia *downstream* con respecto a la secuencia *wild type* (score: 0,76) (Figura 36).

Human Splicing Finder					
Splice site analysis: Results					
<b>A</b> <i>Wild Type</i>	294	Acceptor	ATTACAGGtaagga	attacaggttaagGA	72.99
	298	Acceptor	CAGGtaaggatg	caggttaaggagGG	67.61
	298	Donor	CAGGtaagg	CAGGtaagg	98.07
	322	Acceptor	tcacacatcagca	tcacacatcagCA	80.92
	325	Acceptor	acacatcagagat	acacatcagagAT	80.09
	356	Acceptor	aaattctcaaaa	aaattctcaaaaA	71.93
<b>B</b> <b>c.1164+1 G&gt;A</b>	377	Acceptor	ccaagggtcagct	ccaagggtcagCT	79.98
	381	Donor	aaggtcagc	AAGgtcagc	91.85
	388	Acceptor	gctctataaaagaa	gctctataaaagAA	72.57
	400	Acceptor	aaattcttctcagga	aaattcttctcagGA	83.48

**Figura 35:** Análisis *In silico* generado por *Human Splicing Finder* de la mutación intrónica **c.1164+1G>A**. (A) Tabla que indica el análisis de la secuencia *wild type*, en el recuadro se indica la secuencia del sitio donador de *splicing wild type* en la posición 298 (CAGGtaagg) (98% de confianza). (B) Tabla que indica el análisis de la secuencia correspondiente a la mutación **c.1164+1 G>A**, en el recuadro se indica el cambio de la secuencia del sitio donador de *splicing* en la posición 381 que cambia una secuencia intrónica (aaggtcagc) por una secuencia que quedaría incluida en el exón (AAGgtcagc) (91,85% de confianza). Las iniciales en mayúscula corresponden a los nucleótidos incluidos en la secuencia exónica y las minúsculas en la secuencia intrónica.



**Figura 36:Análisis In silico generado por NetGene2 de la mutación intrónica c.1164+1 G>A.**(A) Análisis de la secuencia *wild type*, en el recuadro se indica la secuencia del sitio donador críptico de *splicing* en la posición 301 *downstream* (83% de confianza). (B) Análisis de la secuencia correspondiente a la mutación c.1164+1 G>A, en el recuadro se indica el cambio de la secuencia del sitio donador críptico de *splicing* en la posición 522 (76% de confianza).El símbolo (^) indica el sitio donador de *splicing*.

En su conjunto los análisis realizados indican que la mutación c.1164+1 G>A produciría una alteración en un sitio donador de *splicing* entre los exones 3 y 4 del gen *EXT1* produciendo una retención de secuencias intrónicas dentro del exón 3 del gen *EXT1* saltando el sitio de *splicing*.

### 3. Base de Datos internacional “Multiple Osteochondromatosis database”

Con el objetivo de realizar una actualización continua de las variantes genómicas encontradas en los genes *EXT1* y *EXT2* en el mes de julio del año 2009 participamos en la creación de una base de datos para OM “Multiple Osteochondromatosis database” MOdb (<http://medgen.ua.ac.be/LOVD>) basada en un software LOVD(<http://www.lovd.nl>)(Fokkema et al., 2005; Jennes et al., 2009). Es una base de

datos con un formato para la recolección, visualización y preservación de las variantes en el ADN de genes específicos. Cada uno de los genes *EXT1* y *EXT2* tiene su propia página que contiene un resumen con la información general, incluyendo variantes que se encontraron por única vez o el número de reportes de las variantes que se encontraron múltiples veces. Esta página *web* presenta una serie de tablas que contienen los cambios encontrados en las secuencias de ADN de pacientes con osteocondromatosis. Además se registraron las variantes que no tienen un efecto en el fenotipo (polimorfismos o *SNPs*), excluyendo variantes con efectos desconocidos. Las variantes están descritas de acuerdo a la Sociedad de la Variación del Genoma Humano "*Human Genome Variation Society*" (HGVS) guidelines (<http://www.hgvs.org>) (den Dunnen & Antonarakis, 2000), y están numerados de acuerdo a las secuencias de *cDNA* del GenBank (NM\_000127.2 para *EXT1*, y NM\_207122.1 para *EXT2*). Todas las mutaciones fueron analizadas con el software *Alamut Mutation Interpretation Software* (*Interactive Biosoftware, Rouen, France*) de acuerdo a la guía de nomenclatura HGVS y para el potencial efecto patogénico. Se provee el tipo de mutación, asociada al fenotipo y la frecuencia, las referencias si fue publicada y el origen étnico.

En esta base de datos fueron reportadas las mutaciones observadas en esta tesis (citadas en Tablas como descritas en LOVD) y provenientes de otros centros de referencia (de tres continentes). Se incluyeron al momento de su creación, 895 entradas para OM constituidas por 585 para el gen *EXT1* que consistieron en 351 mutaciones únicas y 10 polimorfismos, y 310 para el gen *EXT2* compuestas por 166 mutaciones únicas y 21 polimorfismos. El 77% de las variantes de los genes *EXT1* y *EXT2* consisten en mutaciones nuevas. La creación de esta base de datos permitió reportar numerosas mutaciones privadas demostrando la heterogeneidad alélica de ambos genes *EXT* en los pacientes con OM. Además, contribuye a proveer una visión completa y actualizada de las variantes reportadas de los genes *EXT* que están involucradas en el desarrollo de OM que son actualizadas regularmente por sus respectivos administradores (Jenneset al., 2009).

En la tabla 9 se han organizado las mutaciones encontradas, conjuntamente con el análisis de las variables que permitieron determinar el fenotipo clínico en los 33 pacientes correspondientes a este estudio.

Tabla 9: Análisis de variables clínicas y moleculares de pacientes estudiados

Paciente	Sexo	Gen	Cambio en cDNA	Cambio en la proteína	MLPA	Historia Familiar	Fenotipo/ Severidad	Edad de inicio	Otras características clínicas
P01	M	EXT2	c.1182G>A	p.Trp394*	NR	No	OM/IIIS	1,5 años	Localización vertebral
P02	F	EXT1	c.1469delT	p.Leu490Argfs*9	NR	No	OM/IIIS	5 años	Sinostosis y cirugías
P03	F	ND	.....	.....	Normal	No	OS	5 años	Osteocondroma en húmero
P04	M	EXT2	ex 8 del	Desconocido	Anormal	No	OM/IIIS	5 meses	Acortamiento de extremidades
P05	M	EXT1	c.752delT	p.Leu251*	NR	Sí	OM/IVS	4 años	Desviación de ejes de cúbito y radio
P06	M	EXT1	c.848T>A	p.Leu283*	Normal	Sí	OM/IVS	12 años	<b>Condrosarcoma</b> , cirugía
P07	F	ND	.....	.....	Normal	No	OS	6 años	Cirugía
P08	F	EXT1	c.1037G>C	p.Arg346Thr	NR	No	OM/IIIS	3 años	Escoliosis
P12	M	EXT2	ex6-16del	Desconocido	Anormal	Sí	OM/IVS	2 meses	Ubicación escapular y en costillas, (delección 18q)
P13	M	EXT2	c.920_929del10insTG	p.Asp307Valfs*45	NR	Sí	OM/IIIS	2 meses	Lesiones escapulares
P14	F	EXT1	c.369_370delAG	p.Lys126Asnfs*62	Normal	Sí	OM/IS	1 año	Deformidad del talón
P15	M	EXT1	c.232insG	p.Val78Glyfs*111	NR	No	OM/M	8 años	Densidad ósea disminuida
P16	M	EXT1	c.916A>T	p.Lys306*	NR	No	OM/M	4 años	Movimientos articulares restringidos
P17	M	EXT1	c.791T>C	p.Leu264Pro	NR	Sí	OM/IIIS	1 mes	Lesiones en costillas
P18	M	ND	.....	.....	Normal	No	OS	14 años	ND
P19	M	ND	c.626+1G>A	.....	Normal	Sí	OM/ND	8 años	Lesiones en costillas
P21	M	ND	.....	.....	Normal	No	OM/ND	9 años	Cirugía
P24	M	ND	.....	.....	Normal	No	OM/IIIS	2 años	Acortamiento y deformidades de las extremidades
P25	F	ND	.....	.....	Normal	Sí	OM/IIIS	5 años	Ubicación vertebral
P26	F	ND	.....	.....	Normal	No	OM/M	11 años	Escoliosis
P27	F	EXT2	c.1616_1623del8ins10	p.Asp539Glnfs*5	Normal	No	OM/ND	2 meses	Deformidad de cadera
P28	M	EXT1	c.1164+1G>A.	--	Normal	Sí	OM/ND	10 m	Valgo
P29	F	EXT1	c.1722+1G>A	p.Glu574*	Normal	No	OM/IVS	1 meses	Escoliosis
P30	F	ND	.....	.....	Normal	No	OS	4 años	Restricción en movimientos
P31	M	ND	.....	.....	Normal	No	OS	8 años	Valgo bilateral
P32	F	ND	.....	.....	Normal	No	OS	9 años	ND
P34	F	ND	.....	.....	Normal	Sí	OM/IS	3 años	Valgo bilateral, localización vertebral
P36*	F	EXT1	ex 1del	Desconocido	Anormal	No	OM/M	10 años	ND
P37	M	EXT1	c.248_249insA	p.Gln84Alafs*105	NR	No	OM/ND	5 meses	Distrofia de costillas
P38	M	ND	.....	.....	Normal	Sí	OM/IIIS	10 años	<b>Condrosarcoma/</b> Compresión vascular y flebitis
P39	F	ND	.....	.....	Normal	NA	OM/ND	12 años	Deformidad de tobillos
P40	M	EXT1	c.1018C>T	p.Arg340Cys	NR	Sí	OM/IIIS	2 meses	Lesiones escapulares
P41	M	EXT1	c.1219C>T	p.Gln407*	NR	Sí	OM/IIIS	1 año	Lesiones escapulares y pélvicas

Las mutaciones nuevas y los pacientes que presentaron transformación maligna a condrosarcoma están remarcados en negritas. (NR) Análisis de MLPA no realizado. (ND) No Disponible; (S) Fenotipo Severo; (M) Fenotipo Moderado; (OM) Osteocondromatosis Múltiple; (OS) Osteocondroma Solitario.

\*Paciente documentado como OS pero detectado como OM con síntomas muy moderados (una sola lesión).

#### **4. Análisis de pérdida de heterocigocidad (LOH) específica de tejido**

Este análisis fue realizado según la disponibilidad de muestras de tejido (ostecondromas) obtenidas de pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas (n=4). Se analizó el ADNg extraído de tejido, PCR y secuenciación directa, como así también MLPA cuando fue necesario. Las muestras analizadas correspondían a ADN extraído de tejido de ostecondromas de los pacientes P02, P07 y P08 y P06 (ADN extraído de un condrosarcoma). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

##### **4.1 En ostecondromas**

En el **P02**, había sido detectada una mutación en heterocigosis, a nivel de ADN genómico de sangre periférica en el exón 6 del gen *EXT1* (c.1469delT, p.Leu490ArgfsX9), la cual fue observada en material proveniente de tejido y sin presencia de un segundo alelo mutado. En el **P07**, no se detectaron mutaciones en ninguno de los genes (*EXT1* y *EXT2*) a nivel de ADN genómico de sangre periférica ni proveniente de tejido de ostecondroma. Además, el estudio de MLPA para este paciente fue normal. En el **P08** se había detectado una mutación en heterocigosis, en el ADN de sangre periférica en el exón 2 del gen *EXT1* (c.1037G>C, p.Arg346Thr) y mediante este estudio se observó la misma mutación, sin presencia de un segundo alelo mutado. En resumen, no se detectó LOH en los genes *EXT1* y *EXT2* al analizar el ADN extraído de material proveniente del ostecondroma de los pacientes analizados.

##### **4.2 En condrosarcoma**

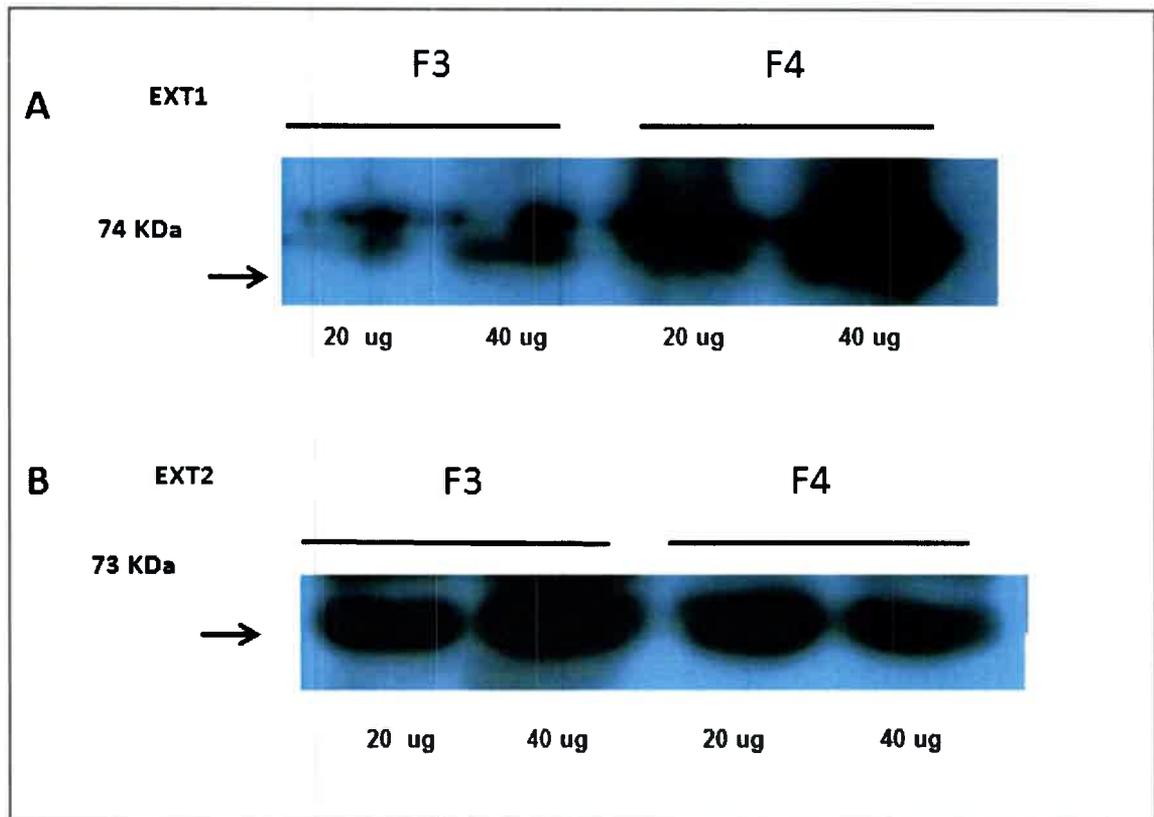
En el **P06**, que presentó malignización de un ostecondroma de pelvis en condrosarcoma secundario periférico, había sido detectada una mutación en el exón 1 del gen *EXT1*, (c.848T>A, p.Leu283\*) en heterocigosis en ADNg proveniente de sangre periférica (Delgado et al., 2012). Mediante este estudio, se pudo observar la misma mutación en el ADNg de tejido malignizado, sin presencia de un segundo alelo mutado, no se detectó LOH en el gen *EXT1* ni cambio en el gen *EXT2* al analizar el ADN extraído de material proveniente del condrosarcoma.

## PARTE B

### **5. Expresión de las proteínas exostosina 1 y exostosina 2 en osteocondromas y condrosarcoma humanos**

La expresión de las proteínas EXT1 y EXT2, fue analizada según la metodología descrita por Hameetman et al., 2007. En primera instancia se estandarizó el método de detección de estas proteínas en un homogeneizado de tejido de cartílago de controles normales, a partir de la obtención de diferentes fracciones subcelulares por centrifugación diferencial, como fue descrito en material y métodos.

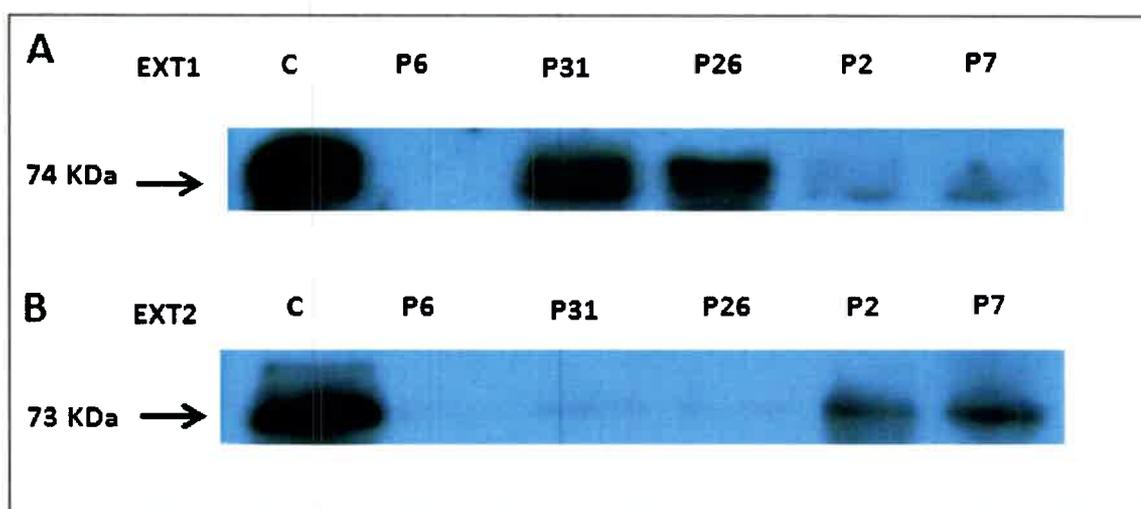
A partir de las fracciones F3 (precipitado obtenido en la 3<sup>er</sup> centrifugación) y F4 (sobrenadante obtenido en la 3<sup>er</sup> centrifugación), las proteínas del homogeneizado fueron separadas mediante SDS-PAGE y *Western blot* con la utilización de los anticuerpos específicos. Se observó para la proteína EXT1, una banda de un tamaño aproximado de 74 KD y para la proteína EXT2 un fragmento mayoritario que corresponde a la banda de 73KD. Las imágenes fueron analizadas mediante densitometría arbitraria con *Image J Software* (<http://imagej.nih.gov/ij>). En la Figura 37, se observa una imagen de la detección de las proteínas EXT1 y EXT2 en las diferentes fracciones subcelulares obtenidas, a partir del procesamiento de tejido cartilaginoso normal (Figura 38 A y B). Se seleccionó para el análisis de las muestras de osteocondromas de pacientes, la *fracción 4*, que se corresponde con la fracción microsomal enriquecida en membranas de Golgi y en la cual se detectan bandas mayoritarias correspondientes a las proteínas EXT1 y EXT2 (Bernard et al., 2001; Trebicz-Geffen et al., 2008).



**Figura 37: Detección en cartílago normal de las proteínas EXT1 y EXT2.** Los tejidos fueron homogeneizados mecánicamente, las fracciones 3 y 4 (F3 y F4) correspondientes a las fracciones subcelulares fueron obtenidas a partir de la separación por centrifugación diferencial y posteriormente sonicadas. Se analizaron por SDS-PAGE [20 µg y 40 µg] de proteínas totales de F3 obtenida del precipitado de la 3<sup>er</sup> centrifugación y la F4 obtenida del sobrenadante de la 3<sup>er</sup> centrifugación y se incubaron con anticuerpos anti-EXT1 y anti-EXT2 respectivamente. El revelado se realizó con quimioluminiscencia (ECL, GE). (A) Perfil obtenido para EXT1, la flecha indica la banda específica para esta proteína de 74 KDa. (B) Perfil obtenido para EXT2, la flecha que indica la banda específica para esta proteína de 73 KDa.

La expresión en membrana de ambas proteínas fue cuantificada en muestras de material biológico provenientes de osteocondromas de cinco pacientes sujetos a cirugía, de los cuales 3 presentaban osteocondromatosis múltiple (P02, P06 y P26) y diferentes grados de severidad fenotípica (P06 fenotipo severo con malignización) y 2 provenientes de osteocondromas solitarios (P07 y P31). Las muestras fueron analizadas conjuntamente con las provenientes de cartílago de controles normales (n=4). Se observó una expresión disminuida de ambas proteínas en tejido proveniente de osteocondromas. Las bandas de la proteína EXT1 (74 KDa) y/o de EXT2 (73 KDa) se observaron disminuidas o nulas en los pacientes estudiados (Figuras 38 A y B). Se observaron niveles disminuidos de la proteína EXT1 (50%) en P26 y (70%) en P31 (Figura 38 A) y una expresión muy disminuida de la proteína EXT2 (10% y 12% respectivamente) (Figura 38 B). Por el contrario, en los pacientes P02 y P07 se

observó mayormente disminuida la expresión de EXT1 (11% y 12%) (Figura 39 A) y en menor proporción EXT2 (20% y 30% respectivamente) (Figura 38 B). En el análisis del material proveniente de condrosarcoma (P06), los niveles de ambas proteínas fueron indetectables (Figuras 38 A y B).

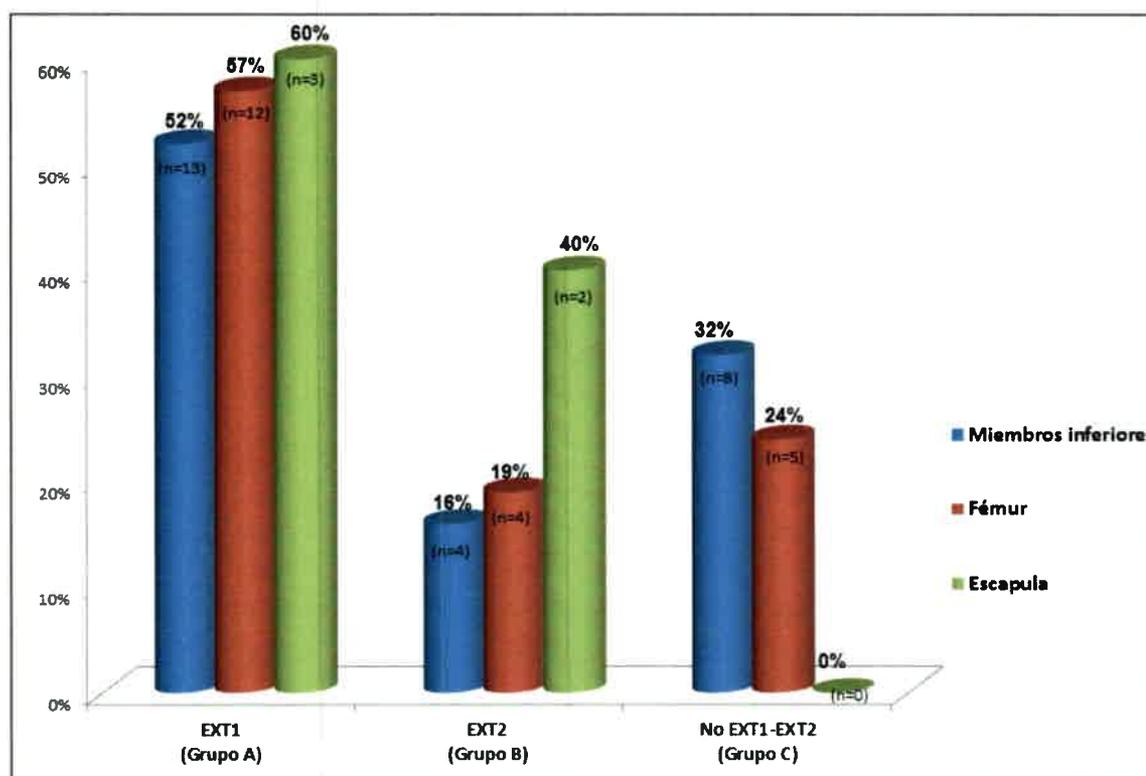


**Figura 38: Detección en osteocondromas de las proteínas EXT1 y EXT2.**(A)EXT1 y (B) EXT2 en muestras extraídas de osteocondromas de los pacientes con OM (P6, P26 and P2), osteocondromas solitarios (P31 y P7) y tejido normal (C). Los tejidos fueron homogeneizados mecánicamente, las fracciones F4 obtenidas a partir de la separación por centrifugación diferencial y posteriormente sonicadas. Se analizaron por SDS-PAGE 20  $\mu$ g de proteínas totales de la fracción 4 obtenida de la 3<sup>er</sup> centrifugación y se incubaron con anticuerpos anti-EXT1 y anti-EXT2 respectivamente. El revelado se realizó con quimioluminiscencia (ECL, GE). La cuantificación densitométrica de realizó en las imágenes de las dos bandas detectadas según cada anticuerpo específico, de 74 kDa para EXT1 y de 73 kDa para EXT2.

## 6. Análisis de asociación de variables fenotípicas en relación con el genotipo en pacientes con EXT1/EXT2-CDG

Se analizó estadísticamente la posible asociación de diferentes variables clínicas analizadas con respecto a los 3 grupos de pacientes con OM determinados: grupo (A) pacientes que presentaron mutaciones en el gen *EXT1*(n=14), grupo (B) pacientes que presentaron mutaciones en el gen *EXT2*(n=6), y grupo (C) pacientes que no presentaron mutaciones en ambos genes(n=7). Se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos de pacientes con respecto a las siguientes variables: 1) presencia de lesiones en miembros inferiores, 2) localización de lesiones en fémur, 3) localización de lesiones en escápula. Los resultados obtenidos con respecto al análisis de asociación de las variables anteriormente citadas fueron: 1) El 100% (n=25) de pacientes con OM(n=25, 2 sin datos) presentaron lesiones en miembros inferiores, y estuvo representado por 52% (n=13) de pacientes que pertenecieron al grupo A, 16%

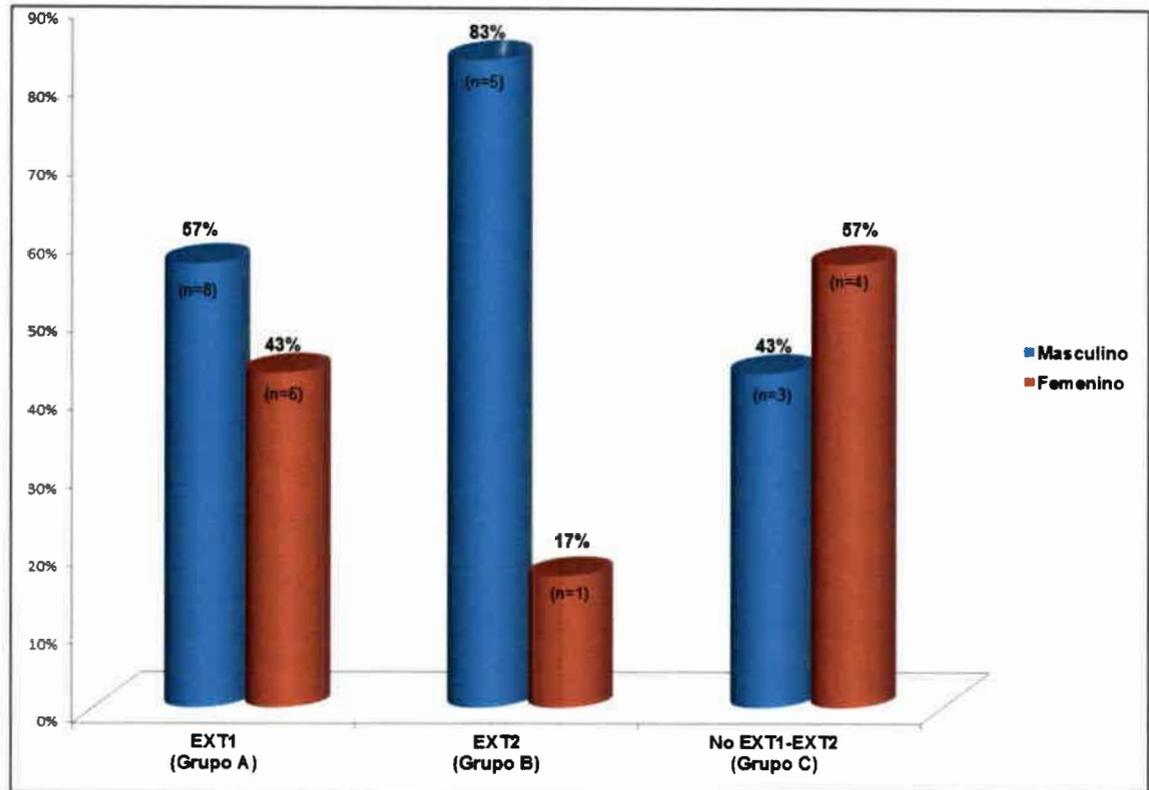
(n=4) al grupo B y 32% (n=8) al grupo C ( $p=0,0417$ ). 2) El 84% (n=21) del total de los pacientes con OM que participaron de este estudio (n=25, 2 sin datos), presentaron lesiones en fémur, de los cuales 57% (n=12) de pacientes pertenecieron al grupo A, 19% (n=4) al grupo B y 24% (n=5) al grupo C ( $p=0,0251$ ). 3) El 20% (n=5) del total de los pacientes que participaron de este estudio (n=25, 2 sin datos), presentaron lesiones en escápula y estuvo representado por 60% (n=3) de pacientes que pertenecieron al grupo A, 40% (n=2) al grupo B y no hubo pacientes del grupo C (n=0) ( $p=0,0396$ ). El valor de  $p$  fue calculado con el estadístico Chi Cuadrado MV-G2 (Figura 39).



**Figura 39: Localización de osteocondromas en los 3 grupos con OM.** Gráfico que relaciona los porcentajes de la localización de los osteocondromas en miembros inferiores (azul) (n=25) ( $p=0,0417$ ), fémur (rojo) (n=18) ( $p=0,0251$ ) y escápula (verde) (n=5) ( $p=0,0396$ ), con respecto a los 3 grupos de pacientes analizados en este estudio: Pacientes que presentaron mutaciones en el gen *EXT1* (grupo A), pacientes con mutaciones en el gen *EXT2* (grupo B) y pacientes que no presentaron mutaciones en ambos genes (grupo C) (n=27). \*Valor de  $p$ : calculado con el estadístico Chi Cuadrado MV-G2. n=25 (2 sin datos).

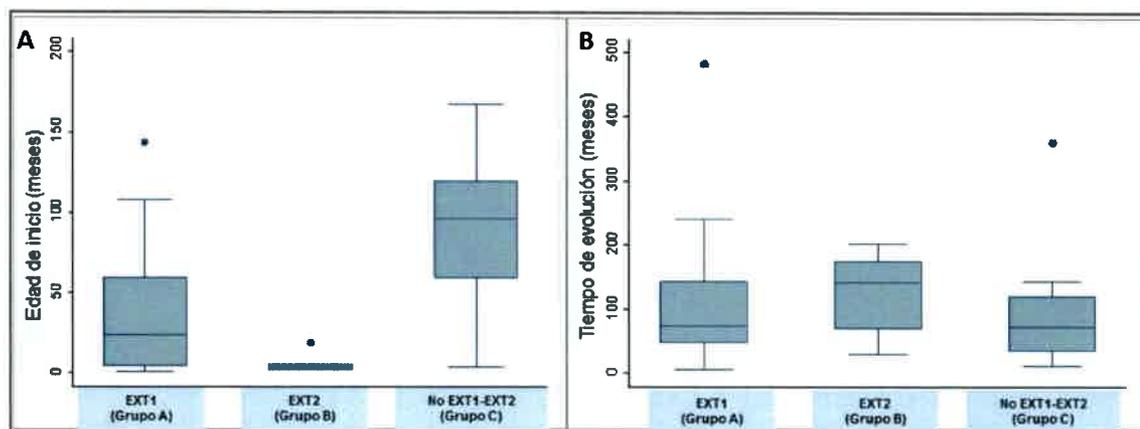
Mediante el análisis de asociación entre el sexo de los pacientes con OM y los 3 grupos de pacientes analizados no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,0891$ ) (n=27). El grupo A (n=14) estuvo representado por 57% (n=8) de pacientes de sexo masculino y 43% (n=6) de sexo femenino, el grupo B (n=6) 83% (n=5) de sexo

masculino y 17% (n=1) de sexo femenino, y el grupo C (n=7) 43% (n=3) de sexo masculino y 57% (n=4) de sexo femenino (Figura 40).



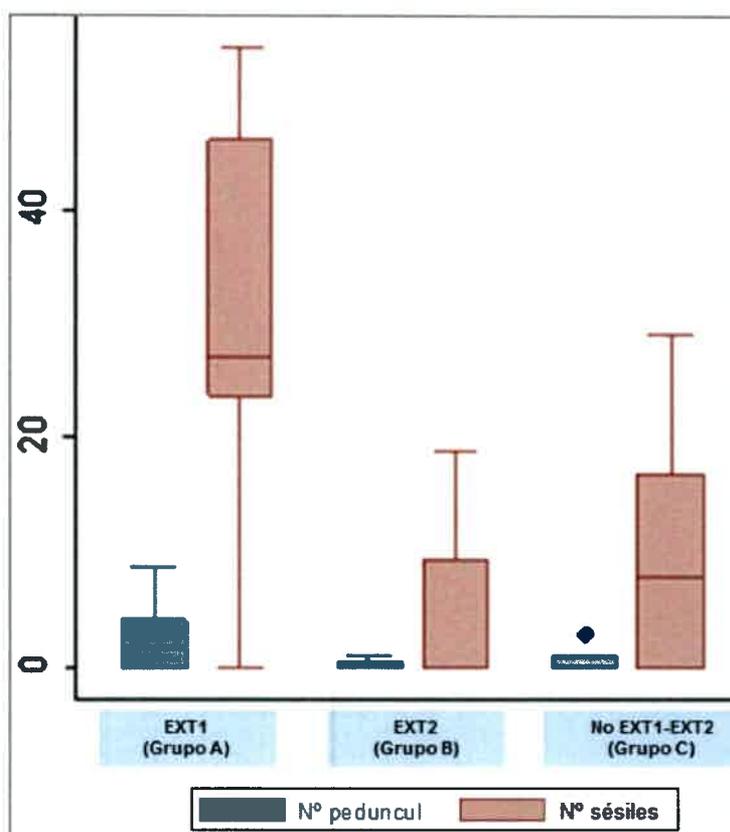
**Figura 40: Análisis de asociación según el sexo en los 3 grupos con OM.** Gráfico que relaciona los porcentajes de pacientes de sexo masculino (azul) y femenino (rojo) con respecto a los 3 grupos de pacientes analizados en este estudio: Pacientes que presentaron mutaciones en el gen *EXT1* (grupo A) (n=14), pacientes con mutaciones en el gen *EXT2* (grupo B) (n=6) y pacientes que no presentaron mutaciones en ambos genes (grupo C) (n=7) (p=0,0891) \*Valor de p: calculado con el estadístico Chi Cuadrado MV-G2 (n=27).

El análisis estadístico de asociación respecto a la edad de inicio de la enfermedad y el tiempo de evolución de las lesiones, los tres grupos de pacientes con OM analizados, mediante prueba de Kruskal-Wallis, se demostró una diferencia significativa entre los 3 grupos de pacientes, con respecto a la edad de inicio de la enfermedad. Los pacientes del grupo (A) presentaron una edad de inicio de 42+/-45 meses (3,5+/-3,8 años), los del grupo (B) 7,2+/-7,2 meses (0,6+/-0,6 años) y los del grupo (C) 89+/-48 meses (7,4+/-4 años de edad) (p=0,005) (Figura 41 A). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en el análisis de asociación entre el tiempo de evolución de la enfermedad y los 3 grupos de pacientes analizados (A, B y C) (p=0,5956) (Figura 41 B) (n=27).



**Figura 41:** Análisis de asociación entre edad de inicio y tiempo de evolución de la enfermedad en los 3 grupos de pacientes con OM. Gráfico que relaciona (A) la edad de inicio de la enfermedad (meses) ( $p=0,005$ ) y (B) el tiempo de evolución de la enfermedad (meses) ( $p=0,5956$ ) en pacientes que presentaron mutaciones en el gen *EXT1* (grupo A) ( $n=14$ ), pacientes con mutaciones en el gen *EXT2* (grupo B) ( $n=6$ ) y pacientes que no presentaron mutaciones en ambos genes (grupo C) ( $n=7$ ). La barra horizontal negra indica la mediana, y los 2 extremos inferiores y superiores de la caja, los percentiles 25 y 75 respectivamente. Las barras verticales representan la distribución de la muestra, la parte superior e inferior de las barras representan los valores máximos y mínimos respectivamente. Los círculos muestran valores extremos. \*Valor de  $p$ : calculado con el estadístico mediante prueba de Kruskal-Wallis ( $n=27$ ).

El análisis de asociación entre el número de lesiones sésiles y pedunculadas, en los tres grupos pacientes con OM, fue realizado mediante prueba de Kruskal-Wallis. Mediante este estudio comparativo no se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos de pacientes analizados ( $p=0,9908$ ). Con respecto al número de lesiones pedunculadas los pacientes del grupo A presentaron valores de  $2 \pm 2,6$  lesiones ( $n=12$  pacientes); los del grupo B 1 lesión ( $n=1$  paciente) y los del grupo C  $1,5 \pm 1,2$  lesiones ( $n=6$  pacientes) (Figura 42). Con respecto al número de lesiones sésiles los pacientes del grupo A presentaron valores de  $32,7 \pm 15$  lesiones ( $n=12$  pacientes); los del grupo B 19 lesiones ( $n=1$  paciente) y los del grupo C  $18,2 \pm 8,9$  lesiones ( $n=6$  pacientes) (Figura 42).



**Figura 42: Análisis de asociación entre el tipo de osteocondromas en los 3 grupos de pacientes con OM.** Gráfico que relaciona el número de osteocondromas: pedunculados (azul) ó sésiles (rojo) ( $p=0,9908$ ) en pacientes que presentaron mutaciones en el gen *EXT1* (grupo A), pacientes con mutaciones en el gen *EXT2* (grupo B) y pacientes que no presentaron mutaciones en ambos genes (grupo C). La barra horizontal negra indica la mediana, y los 2 extremos inferiores y superiores de la caja, los percentiles 25 y 75 respectivamente. Las barras verticales representan la distribución de la muestra, la parte superior e inferior de las barras representan los valores máximos y mínimos respectivamente. Los círculos muestran valores extremos. \*Valor de  $p$ : calculado con el estadístico Chi Cuadrado MV-G2 ( $n=19$  pacientes, 8 sin datos).

Con respecto a las demás variables clínicas analizadas: dolor provocado por las lesiones, malignización de osteocondromas a condrosarcomas, acortamiento de extremidades, percentil de altura  $<10$ , escoliosis, deformidades en huesos (en extremidades inferiores y superiores), mediante este estudio comparativo no se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos de pacientes analizados (A, B y C) como se describe en la (Tabla 11). De igual modo, no se mostraron diferencias significativas en la asociación entre el tipo de herencia (“*de novo*”, materna ó paterna) con respecto a los 3 grupos de pacientes analizados (Tabla 12).

Del total de los pacientes con OM que participaron de este estudio ( $n=27$ ), 14 manifestaron dolor provocado por las lesiones, 8 pacientes que pertenecieron al grupo A, 1 paciente al grupo B y 5 al grupo C ( $p=0,2995$ ). Solamente 2 pacientes con OM presentaron malignización de osteocondromas a condrosarcomas y estuvo

representado por 1 paciente del grupo A y 1 paciente del grupo C ( $p=0,7023$ ). Con respecto al análisis del acortamiento de las extremidades y percentil de altura  $<10$  en los pacientes con OM que participaron de este estudio ( $n=25$ , 2 sin datos), en 11 pacientes se observó acortamiento de las extremidades, y estuvo representado por 4 pacientes que pertenecieron al grupo A, 3 al grupo B y 4 al grupo C ( $p=0,4375$ ). De los mismos, 10 pacientes presentaron percentil de altura  $<10$ , representado por 7 pacientes que pertenecieron al grupo A, 1 paciente al grupo B ( $n=1$ ) y 2 al grupo C ( $p=0,4185$ ). Respecto al análisis de asociación entre la presencia de escoliosis y deformidades en huesos en los pacientes con OM que participaron de este estudio ( $n=23$ , 4 sin datos), 6 pacientes presentaron escoliosis, estuvo representado por 5 pacientes que pertenecieron al grupo A y 1 paciente al grupo C, mientras que no se encontraron pacientes clasificados en el grupo B ( $p=0,0613$ ). Deformidades en los huesos se observaron en 19 pacientes, representados por 10 pacientes del grupo A, 3 del grupo B y 6 del grupo C ( $p=0,4059$ ) (Tabla 10).

Tabla 10: Análisis de asociación entre diferentes variables clínicas con respecto a los 3 grupos de pacientes con OM

<b>Variabes analizadas</b>	<b>Grupo A Mutaciones en EXT1 (%, n)</b>	<b>Grupo B Mutaciones en EXT2 (%, n)</b>	<b>Grupo C Sin mutaciones en EXT1-EXT2 (%, n)</b>	<b>Valor de p</b>
Dolor (n=14)	57% (n=8)	7% (n=1)	36% (n=5)	$p=0,2995$
Malignización (n=2)	50% (n=1)	-	50% (n=1)	$p=0,7023$
Acortamiento de extremidades(n=11)	36% (n=4)	28% (n=3)	36% (n=4)	$p=0,4375$
Percentil de Altura $<10$ (n=10)	70% (n=7)	10% (n=1)	20% (n=2)	$p=0,4185$
Escoliosis (n=6)	83% (n=5)	-	17% (n=1)	$p=0,0613$
Otras deformidades óseas (n=19)	53% (n=10)	16% (n=3)	31% (n=6)	$p=0,4059$

\*Valor de p: calculado con el estadístico Chi Cuadrado MV-G2. Frecuencias relativas y absolutas: (% , n)

El análisis de asociación, respecto al tipo de herencia (“*de novo*”, herencia materna ó paterna), realizado teniendo en cuenta sólo los pacientes en los que pudo ser determinada esta variable (n=25, 2 sin datos), no mostró diferencias significativas entre los 3 grupos de pacientes OM analizados ( $p=0,0909$ ). Del grupo de pacientes con OM incluidos en el grupo A (n=13), 7 manifestaron una presentación clínica *de novo*, 4 presentaron herencia materna y 2 herencia paterna. Con respecto a los pacientes del grupo B (n=6) el 3 presentaron mutaciones *de novo* y 3 herencia paterna. Los pacientes pertenecientes al grupo C (n=6), 3 mostraron una presentación clínica *de novo* y presentando los 3 pacientes restantes herencia paterna (Tabla11).

Tabla 11: Análisis de asociación según el tipo de herencia con respecto a los 3 grupos de pacientes con OM

Herencia (n=25)	Grupo A Mutaciones en <i>EXT1</i> (n=13, 1 sin datos) (%, n)	Grupo B Mutaciones en <i>EXT2</i> (n=6) (%, n)	Grupo C Sin mutaciones en <i>EXT1-EXT2</i> (n=6, 1 sin datos) (%, n)	Valor de <i>p</i>
<i>De novo</i> (n=13)	54% (n=7)	50% (n=3)	50% (n=3)	$p=0,0909$
Materna (n=4)	31% (n=4)	-	-	
Paterna (n=8)	15% (n=2)	50% (n=3)	50% (n=3)	

\*Valor de *p*: calculado con el estadístico Chi Cuadrado MV-G2. (n= 25, 2 sin datos). Frecuencias relativas y absolutas: (% , n)

No se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos de pacientes con OM (A, B y C) (n=21, 6 sin datos) ( $p=0,3346$ ) con respecto a la asociación entre el genotipo y los grupos con diferentes grados de severidad fenotípica que fueron determinados a partir del análisis de las variables clínicas-radiológicas. Con respecto al grupo de pacientes con OM del Grupo A (n=12, 2 sin datos) 3 presentaron fenotipo moderado (M) y 9 estuvieron distribuidos en los diferentes subgrupos del fenotipo severo (S): 1 paciente en el grupo IS, 5 en el grupo IIS, y 3 en el grupo de mayor severidad IVS. En los pacientes analizados del Grupo B (n=4, 2 sin datos), no se encontraron pacientes con fenotipo moderado (M). Los mismos estuvieron distribuidos en los diferentes subgrupos del fenotipo severo (S): 2 pacientes presentaron fenotipo IIS, 1 fenotipo IIIS, y 1 paciente presentó fenotipo IVS. Con respecto a los pacientes

con OM incluidos en el grupo C (n=6, 1 sin datos), 1 paciente presentó fenotipo moderado (M) y los pacientes restantes estuvieron distribuidos en los diferentes subgrupos del fenotipo severo (S): 1 paciente presentó IS, 2 pacientes IIS y 2 pacientes IIIS (Tabla 12).

Tabla 12: Tabla 12: Análisis de asociación entre los genes afectados y la clasificación fenotípica con respecto a los 3 grupos de pacientes con OM

Clasificación fenotípica		Grupo A Mutaciones en <i>EXT1</i> (n=12, 2 sin datos) (%, n)	Grupo B Mutaciones en <i>EXT2</i> (n=4, 2 sin datos) (%, n)	Grupo C Sin mutaciones en <i>EXT1-EXT2</i> (n=6, 1 sin datos) (%, n)	Valor de <i>p</i>
Moderado (M) (n=4)		25% (n=3)	-	20% (n=1)	<i>p</i> =0,3346
Severo (S) (n=18)	IS (n=2)	8% (n=1)	-	20% (n=1)	
	IIS (n=9)	42% (n=5)	50%(n=2)	40% (n=2)	
	IIIS (n=3)	-	25% (n=1)	20% (n=2)	
	IVS (n=4)	25% (n=3).	25% (n=1)	-	

\*Valor de *p*: calculado con el estadístico Chi Cuadrado MV-G2; n= 22 (5 sin datos). Grados de severidad: (IS, IIS, IIS y IVS). Frecuencias relativas y absolutas: (%), (n).

Se realizó un análisis estadístico descriptivo en los pacientes con OM (n=16) para relacionar el tipo de mutaciones encontradas (*missense*, *nonsense*, *frameshift*, intrónicas que afectan a sitios de *splicing* y grandes deleciones) con respecto a los diferentes grados de clasificación del fenotipo, moderado (M) o Severo, en sus diferentes subgrupos en los que se clasifica al fenotipo Severo (IS, IIS, IIS y IVS). Dentro de este grupo de pacientes, 3 pacientes con fenotipo severo (IIS) presentaron mutaciones “*missense*”, los 5 pacientes que tuvieron mutaciones “*nonsense*” estuvieron clasificados en diferentes subgrupos; 1 paciente presentó fenotipo moderado (M), 1 paciente fue clasificado IIS, 1 paciente IIIS, y 2 pacientes IVS. De los

4 pacientes que presentaron mutaciones “frameshift”, 1 presentó fenotipo moderado (M) y 3 Severo (1 clasificado IS, y 2 pacientes IIS). Con respecto a 1 paciente que presentó una mutación intrónica que afecta a sitios de *splicing*, presentó fenotipo IVS, y de los 3 pacientes que presentaron grandes deleciones, 1 presentó fenotipo moderado (M), 1 paciente IIS y 1 paciente IVS (Tabla 13).

Tabla 13: Análisis de asociación entre tipo de mutaciones y clasificación fenotípica en los pacientes OM estudiados

Tipo de mutación (n=16)	Fenotipo Moderado (M) (n=3) (%, n)	Fenotipo Severo (S)			
		IS (n=1) (%, n)	IIS (n=7) (%, n)	IIS (n=1) (%, n)	IVS (n=4) (%, n)
<i>Nonsense</i> (n=5)	20% (n=1)	-	20% (n=1)	20% (n=1)	40% (n=2)
<i>Frameshift</i> (n=4)	25% (n=1)	25% (n=1)	50% (n=2)	-	-
<i>Missense</i> (n=3)	-	-	100% (n=3)	-	-
Intrónicas (n=1)	-	-	-	-	(n=1)
Grandes deleciones (n=3)	33,3% (n=1)	-	33,3% (n=1)	-	33,3% (n=1)

n=16 (4 sin datos). Frecuencias relativas y absolutas: (% , n).

Con respecto al análisis estadístico de asociación entre los niveles de expresión de ambas proteínas exostosina (EXT) y el análisis del fenotipo, analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los diferentes grados de severidad fenotípica observados ( $p=0,3054$ ).

Los pacientes con OM que presentaron mutaciones en el gen *EXT1* (P02 y P06) estuvieron clasificados en subgrupos del fenotipo severo (IIS y IVS, respectivamente). P02 presentó niveles de expresión de ambas proteínas exostosina muy disminuidos (EXT1 11%, y EXT2 20%) y P06 niveles nulos de ambas proteínas (0%) y ambos pacientes presentaron muy baja estatura (percentil <3). No pudo evidenciarse asociación con la edad de inicio de la enfermedad en estos pacientes, P02 presentó una clasificación fenotípica más leve (IIS) y comenzó con los síntomas a

los 5 años de edad mientras que, P06 fue clasificado en el fenotipo de mayor severidad clínica (IVS) e inició la enfermedad a los 12 años de edad.

En los pacientes con osteocondromas solitarios en los cuales no fueron detectadas mutaciones en ambos genes *EXT* (P07 y P31) se observaron: niveles de expresión muy disminuidos de ambas proteínas exostosina (EXT1 12%, y EXT2 30%) en el P07, mientras que en el P31 una marcada disminución en los niveles de EXT2 (EXT1 70%, y EXT2 12%). En ambos pacientes se iniciaron los síntomas de la enfermedad a edades tempranas (6 y 8 años respectivamente). Por último, en el P26 con OM, se observaron niveles disminuidos de ambas proteínas exostosina (EXT1 50%, y EXT2 10%), con una clasificación fenotípica moderada y percentil de altura >10 con inició la enfermedad a los 11 años de edad (Tabla 14).

Tabla 14: Niveles de expresión de proteínas EXTs en pacientes con OM y OS

Paciente	Gen afectado	Exón	Tipo de mutación	Historia familiar	Proteína EXT1	Proteína EXT2	Fenotipo	Altura (Percentil)	Edad de inicio
P02	<i>EXT1</i>	Exón 6	<i>Frameshift</i> (p.Leu490Argfs*9)	No	11%	20%	OM/IIS	<3	5 años
P06	<i>EXT1</i>	Exón 1	<i>Nonsense</i> (p.Leu283*)	Herencia Materna	0%	0%	OM/ IVS condrosarcoma	<3	12 años
P07	-	ND	-	No	12%	30%	OS	ND	6 años
P26	-	ND	-	No	50%	10%	OM/M	50	11 años
P31	-	ND	-	No	70%	12%	OS	25-50	8 años

\*Valor de  $p:0,3054$ , (OM) osteocondromatosis múltiple, (OS) osteocondroma solitario. Grados de severidad: (IIS, IVS) Severo, (M) Fenotipo moderado. (ND) No determinado.

Se señala el gen afectado en los pacientes con OM que presentaron mutaciones germinales (P02 y P06). Ambas mutaciones ocasionan codones de terminación prematuros en la síntesis proteica. En los pacientes P31, P26 y P07, no fueron detectadas mutaciones al secuenciar las regiones exónicas e intrónicas flanqueantes de los genes *EXT1/EXT2*. Se describe la presencia o ausencia de herencia familiar. La expresión de las proteínas EXT1 y EXT2 muestra los porcentajes de la cuantificación densitométrica de las imágenes de los fragmentos observados por *Western blot* (EXT1 74 KD y EXT2 73KD) comparadas con las obtenidas en controles normales. Se muestra el grado de severidad fenotípica en los cuales fueron clasificados los pacientes, el percentil de altura y la edad de inicio de la enfermedad.

# ***DISCUSIÓN***

Este trabajo de Tesis, ha contribuido a iniciar en nuestro país la investigación de esta enfermedad metabólica hereditaria, reconocida dentro del grupo de los Desórdenes Congénitos de Glicosilación (CDG). En particular, está referido al estudio de alteraciones de la O-glicosilación y a una enfermedad que ha sido conocida desde hace varias décadas como Osteocondromatosis Múltiple hereditaria (OM) y actualmente denominada EXT1/EXT2-CDG al ser determinados los genes responsables de codificar glicosiltransferasas cuyas mutaciones ocasionan esta patología. Estas enzimas juegan un rol determinante en este grupo de patologías, específicamente en la biosíntesis y elongación de O-glicanos. En este sentido, EXT1/EXT2-CDG es una patología debida a alteraciones en el proceso de formación de HSPG, su herencia es autosómica dominante y es la clase de CDG que presenta mayor incidencia a nivel mundial (1/18.000) (De Andrea & Hogendoorn, 2012).

En este estudio, se analizó el fenotipo clínico y la secuencia genómica de los genes *EXT1* y *EXT2*, en 33 pacientes afectados con osteocondromatosis múltiple o solitaria, con rangos de edades que oscilaron entre 2 y 55 años. Los estudios genéticos, comprendieron el análisis de los genes *EXT1* y *EXT2* por secuenciación directa y estudios complementarios, como *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA) y estudio de pérdida de heterocigosidad (LOH). Además se realizó el análisis del nivel de expresión de las proteínas codificadas por los genes *EXT1* y *EXT2* mediante *Western blot* en muestras de tejidos de osteocondromas y condrosarcoma. No obstante las diferentes estrategias metodológicas, en un porcentaje de pacientes con OM (26%) (n=7) no se pudo detectar el defecto a nivel genético en los genes estudiados. Este resultado concuerda con lo descrito anteriormente por otros grupos de trabajo, que presentaron entre 20 y 28% de pacientes sin definición genotípica (Xu et al., 1999; Francannet et al., 2001; Seki et al., 2001; Lonie et al., 2006; Heinritz et al., 2009). Se postula que estos pacientes podrían presentar mutaciones en genes adicionales involucrados en la osificación endocondral (pacientes que presentan herencia familiar) ó, podría deberse a la existencia de mosaicismo a nivel del tejido en los pacientes con casos esporádicos no hereditarios (Pedrini et al., 2011; Jennes et al., 2009; Signori et al., 2007; Stancheva-Ivanova et al., 2011). Posiblemente, estos pacientes presenten alteraciones estructurales de los genes, sin presentar alteraciones en la secuencia o dosis de sus exones para lo cual sería apropiado utilizar otras técnicas, por ejemplo aquellas que permitan el análisis del ARN o que permitan el estudio de la estructura y número de los cromosomas, como el análisis del cariotipo o técnicas de FISH (Hameetman et al., 2007; White et al., 2003).

Al analizar las variables de presentación fenotípica de la patología, en los 33 pacientes estudiados, se observó una alta frecuencia de osteocondromas múltiples (73%) (n=27), mientras que 6 pacientes presentaron una sola lesión (OS) (27%) (Tabla 9). En el grupo de pacientes con OM en los cuales disponíamos de datos de anamnesis clínicas y mapeos óseos (n=24), las manifestaciones fenotípicas más frecuentes fueron: acortamiento de extremidades (n=10), varo o valgo de rodillas (n=17), presencia de dolor por compresión de vasos y nervios (n=14) y baja estatura (menor al décimo percentil) (n=9). Los huesos más afectados en pacientes con OM fueron fémur (86%), tibia (71%), húmero (64%), peroné (62%) y radio (52%). Las lesiones en pelvis, si bien no fueron tan frecuentes (29%) es importante identificarlas y controlarlas debido a la alta frecuencia con la que sufren transformación maligna (Figura 15). Con respecto a los pacientes con un osteocondroma solitario (n=6), el mayor porcentaje respecto a la presentación de la lesión pudo observarse en fémur (50%) (n=3), mientras que en el resto de los pacientes (n=3) estuvieron distribuidas en porcentajes iguales entre cúbito, húmero y radio (16,6%) (Figura 16).

El estudio de estas variables clínicas, permitió determinar el grado de severidad del fenotipo en 78% de pacientes con OM (n=21), quedando un 22% de pacientes con OM (n=6) sin definición del grado de severidad fenotípica por falta de datos clínicos para su análisis (Tabla 9). Dentro de este grupo de pacientes que presentaron un análisis fenotípico completo (n=21), un 81% (n=17), presentaron manifestaciones clínicas que permitieron clasificarlos según las diferentes categorías que se establece el grado de severidad del fenotipo del grupo Severo (grupo S): 12% tipo IS (n=2), 53% tipo IIS (n=9), 12% tipo IIIS (n=2), y 23% tipo IVS (n=4) (Figura 17). El 19% de pacientes restantes presentaron un fenotipo moderado (grupo M) (n=4) (Figura 17). Si observamos los resultados obtenidos, la mayoría de los pacientes con OM fueron clasificados dentro del fenotipo severo, (IS, IIS, IIS y IVS), siendo el grupo IIS en el que se incluyó el mayor número de pacientes (53%). Esto demuestra que los pacientes analizados en este cohorte presentan una gran heterogeneidad fenotípica lo cual es consistente con lo publicado por otros grupos de trabajo (Tabla 13) (Francannet et al., 2001; Álvarez et al., 2006 y 2007, Pedrini et al., 2011).

El fenotipo con mayor severidad clínica (IVS) se pudo observar en 4 pacientes, P05, P06 y P29 que presentaron mutaciones en el gen *EXT1* y P12 en *EXT2*. No se observaron pacientes con ausencia de mutaciones en ambos genes y fenotipo IVS (Tablas 9 y 13). Si bien en este estudio no se observó una relación entre el grado de severidad fenotípica y el genotipo detectado, hemos encontrado un mayor número de pacientes clasificados en el fenotipo de mayor severidad (IVS) y con presencia de

mutaciones en los genes *EXT1* o *EXT2*, en comparación con pacientes en los que no se detectaron mutaciones en ambos genes. Este hecho podría sugerir que mutaciones en los genes *EXT1* o *EXT2* ejercerían un rol más importante en la progresión de la enfermedad, desarrollando el fenotipo de mayor severidad clínica (IVS).

Mediante los estudios moleculares realizados se pudo identificar el alelo mutante en 19 de los 27 pacientes con OM (74%) sin embargo, en 7 pacientes con OM no se encontró el defecto a nivel genético (26%). Se logró observar un rol principal del gen *EXT1* en la génesis de la enfermedad, ya que el 52% de los pacientes con OM presentaron mutaciones en ese gen (n=14) (Figura 22). Este resultado coincide con lo descrito para pacientes con OM caucásicos, en los cuales se ha determinado que el porcentaje mayoritario de mutaciones se detectaron en *EXT1* (72%-75%) y porcentajes menores en *EXT2* (25%-28%) (Francannet et al., 2001; Jennes et al., 2008; Signori et al., 2007, Stancheva-Ivanova et al., 2011; Pedrini et al., 2011).

En los pacientes con OM analizados, la mayoría de las mutaciones localizadas en el gen *EXT1* (n=14) se encontraron en los exones 1 ó 2 (n=10), 1 mutación se localizó en una región anterior al dominio exostosina de la proteína *EXT1* (que abarca desde el aa 1 al 111) y 9 mutaciones afectarían a la zona que codifica al dominio exostosina de la proteína *EXT1* (que abarca desde el aa 111 al 396). Con respecto a las 4 mutaciones restantes, 2 estuvieron localizadas entre los exones 3 y 4 las cuales afectarían la región comprendida entre los aa 396 al 480 de la proteína *EXT1*, y las otras 2 mutaciones entre los exones 6 y 9 que codifican a los aa correspondientes al dominio glicosiltransferasa de la proteína *EXT1* (aa 480 al 729) (Tabla 8)([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). En conjunto, dichas mutaciones afectarían el sitio luminal de la proteína *EXT1* que se encuentra localizado entre los aa 29 al 746 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Estos resultados concuerdan con estudios recientes que hipotetizan que mutaciones en los primeros 6 exones, es decir en la región N-terminal de la proteína *EXT1*, podría ser la razón de que estos pacientes presenten mayor grado de severidad del fenotipo clínico debido a una terminación prematura del transcripto que daría una proteína trunca. La terminación prematura de la proteína conduciría a una inhibición parcial o total de su actividad enzimática que induciría a una rápida inactivación, degradación y pérdida de su función biológica (Jennes et al., 2009; Pedrini et al 2011).

Respecto al tipo de mutaciones encontradas en *EXT1*, 8 de las mismas se corresponden con codones *stop* prematuros en etapas tempranas del transcripto, 4 debido a mutaciones que codifican a un codón de terminación contiguo ó "*nonsense*" p.Leu251\*, p.Leu283\*, p.Lys306\* y p.Gln407\* y otras cuatro mutaciones que producen corrimiento del marco de lectura ó "*frameshift*". Estas últimas se corresponden

ap.Gln84Alafs\*105debida a una inserción de una adenina entre los nucleótidos 248-249 en el gen *EXT1* generando un codón de terminación en el aminoácido 189 (Tabla 8), la mutación p.Val78Argfs\*111 que se debió a una duplicación de una guanina en la posición 232 en el gen *EXT1* y determina un codón de terminación en el aminoácido 189 de la proteína *EXT1*, la mutación p.Lys126Asnfs\*62 ocasionada por una deleción de las bases adenina y guanina en la posición 369-370 del gen *EXT1* generando un codón de terminación en el aminoácido 188 de la proteína *EXT1* y por último, la mutación p.Leu490Argfs\*9 generada por una deleción de una timina en la posición 1469 del gen *EXT1* que produce un codón de terminación en el aa 499 de la proteína *EXT1*. En conjunto, estas mutaciones causarían una terminación prematura del transcripto que posiblemente ocasiona una pérdida de la función proteica, ya sea por la ausencia del dominio catalítico exostosina de la proteína *EXT1* (p.Gln84Alafs\*105, p.Val78Argfs\*111, p.Lys126Asnfs\*62), así como por la ausencia del dominio proteico que presenta actividad glicosiltransferasa cerca del extremo C-terminal de la proteína donde se encontró localizada la mutación p.Leu490Argfs\*9 (Wuyts & Van Hul, 2000; Francannet et al., 2001; Lonie et al., 2006; Signori et al., 2007; Jennes et al., 2008; Pedrini et al., 2011; Stancheva-Ivanova et al., 2011).

Tres de las mutaciones detectadas en el gen *EXT1* fueron del tipo *missense* y por análisis *In silico* se pudo determinar su grado de patogenicidad al observar que estas mutaciones podrían dañar la función de la proteína *EXT1*, ya que el análisis de la estructura tridimensional de los dominios de esta proteína con la herramienta bioinformática Phyre2 (*Protein Homology Fold Recognition Engine*, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), predijo que ambas mutaciones *missense* producirían una disminución o pérdida de la función proteica y una alteración en el plegamiento que modificaría la estructura o los dominios glicosiltransferasa de la proteína *EXT1*, modificando de este modo la actividad catalítica de esta proteína. La mutación p.Arg346Thr detectada en el P08 solamente afecta al dominio exostosina de la proteína *EXT1* (Figura 31), mientras que la otra mutación *missense*, p.Leu264Pro observada en P17 produce tanto la remoción de estructuras alfa hélice y lámina beta como la introducción de un segmento lámina beta (Figura 34) (Ciavarella et al., 2013). La mutación *missense* encontrada en el P40, p.Arg340Cys fue reportada con anterioridad y está localizada en un posible dominio de proteólisis ó amidación, que se estima podría ser crucial para el adecuado funcionamiento de la proteína *EXT1* (Phillippe et al., 1997; Dobson-Stone et al., 2000, Francannet et al., 2001, Hall et al., 2002; Vink et al., 2004; Pedrini et al., 2005; Signori et al., 2007). Además, se detectaron tres mutaciones intrónicas en ambos genes, que

afectarían potencialmente a sitios de *splicing* (Figura 23) y corresponden a 2 de las mutaciones detectadas en *EXT1* y 1 en *EXT2* (Tabla 8). Una de ellas localizada en el intrón 3 del gen *EXT1*, c.1164+1G>A, observada en el P28; no fue descrita anteriormente y por medio del análisis *In Silico* se predijo la aparición de sitios donores de *splicing* crípticos a 83 nucleótidos *downstream* (*Human Splice Finder*) (Figura 35) y a 201 nucleótidos *downstream* por medio del programa *NetGene2* (Figura 36). La otra mutación intrónica c.1722+1G>A, detectada en P29, fue reportada anteriormente y está ubicada en un sitio donador de *splicing* del intrón 8 del gen *EXT1* lo cual indica que probablemente sea perjudicial para la proteína *EXT1* (Jennes et al., 2008, Pedrini et al., 2005). Además, se detectó una delección completa del exón 1 del gen *EXT1* observada en P36, descrito anteriormente en la base de datos LOVD (<http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>) (Tabla 8). De las 14 mutaciones encontradas en el gen *EXT1*, 8 fueron nuevas (p.Val78Glyfs\*111, p.Leu264Pro, p.Leu283\* p.Lys306\*, p.Arg346Thr, p.Gln407\*, c.1164+1G>A y la delección completa del exón 1 (ex1 del). Dentro de este grupo de mutaciones no descritas anteriormente, se encuentra p.Leu283\*, detectada en el P06 y en cuál se observó además malignización en un osteocondroma de pelvis. Estos estudios fueron previamente reportados por nuestro grupo de trabajo (Delgado et al., 2012).

Algunas mutaciones ya fueron descritas anteriormente como "*hot spots*", por ejemplo la mutación *missense* p.Arg340Cys detectada en P40 que está ubicada en un sitio crítico para el funcionamiento adecuado de la proteína *EXT1*. Un estudio del efecto ocasionado por mutaciones en el codón 340 del gen *EXT1* produjo como resultado una proteína completamente inactiva para la síntesis del HS *in vitro*, y fue reportada 22 veces en la base de datos LOVD (Phillippe et al., 1997; Dobson-Stone et al., 2000; Francannet et al., 2001; Hall et al., 2002; Vink et al., 2005; Pedrini et al., 2005; Signori et al., 2007; Jennes et al., 2009). Otra mutación descrita en *EXT1* con anterioridad con una prevalencia del 7%, es la mutación *frameshift* encontrada en P02, que afecta al codón p.Leu490. Esta mutación debida a una delección en el exón 6 (p.Leu490Argfs\*9) se encuentra en una zona de polipirimidinas y fue reportada 37 veces en la base de datos LOVD (Ahn et al., 1995; Philippe et al., 1997; Wuyts et al., 1998; Xu et al., 1999; Francannet et al., 2001; Pedrini et al., 2005; Signori et al., 2007; Jennes et al., 2008). La mutación Gln84Alafs\*105 de cambio en la pauta de lectura "*frameshift*" detectada en P37 es debida a una inserción de una base en el exón 1 y fue reportada como "*hot spot*" ya que está ubicada en una zona de polipirimidinas (Tabla 8) (Francannet et al., 2001; Jennes et al., 2009). Otras mutaciones detectadas en zonas no consideradas "*hot spots*", fueron anteriormente descritas; como la

mutación p.Leu251\* detectada en P05 (Ciavarella et al., 2013) así como p.Lys126Asnfs\*62 detectada en P14, fueron reportadas 4 veces en la base de datos LOVD (<http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>). Fue demostrado en estudios anteriores que estas mutaciones afectarían al dominio exostosina de la proteína EXT1 que es un sitio indispensable para la acción enzimática de elongación del HS. (Jennes et al., 2009; McCormick et al., 2000)(<http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>).

Con respecto a las mutaciones encontradas en el gen *EXT2*, las mismas correspondieron a un 22% (n=6) de las mutaciones detectadas en pacientes OM (Figura 22). Su localización fue principalmente en los últimos exones y dichas mutaciones afectarían al sitio luminal de la proteína EXT2 ubicado entre los aminoácidos 47 al 718 (Stickens et al., 1996; Wuyts et al., 1996). Con respecto a la distribución de las mismas, 2 de las mutaciones encontradas estuvieron localizadas en exones que codifican el dominio glicosiltransferasa de la proteína EXT2 (que abarca desde el aminoácido 489 al 734) y correspondieron a una mutación puntual ubicada en el exón 12 y una delección grande que abarca desde el exón 6 al 16. Las cuatro mutaciones restantes se correspondieron con 1 mutación intrónica localizada entre los exones 5 y 6, dos mutaciones puntuales ubicadas en el exón 7 y en el exón 10 respectivamente, y una delección completa del exón 8 afectando aminoácidos correspondientes al dominio exostosina de la proteína EXT2 (que abarca desde el aminoácido 134 al 413) (Tabla 8) ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

En el gen *EXT2*, también se detectaron 3 mutaciones que ocasionaron codones de terminación prematuros en etapas tempranas del transcripto. Una de ellas, en el paciente P01, codifica un codón *stop* contiguo ó "*nonsense*" (p.Trp394\*) y dos de ellas, producen "*frameshift*" p.Asp307ValVfs\*45 en P13 y p.Asp539Glnfs\*5 en P27, generando un codón de terminación en los aminoácidos 352 y 544 de la proteína EXT2 respectivamente. Además, se detectó 1 mutación intrónica; c.626+1G>A observada en el paciente P19 que afectaría potencialmente a sitios de *splicing* en el gen *EXT2*. No se encontraron mutaciones *missense* en este gen. Los cambios genómicos restantes (n=2) fueron delecciones completas de exones: del exón 8 (*EXT2*, ex8 del) observada en P04 y de los exones 6 al 16 (*EXT2* ex6-16del) detectada en P12, ambas detectadas mediante la metodología de MLPA (Tabla 8) (Figura 24). Cuatro de los seis alelos mutados encontrados en el gen *EXT2* no fueron descritos anteriormente (p.Asp307ValVfs\*45, p.Trp394\*, p.Asp539Glnfs\*5, y *EXT2* ex6-16del). Con respecto a la mutación intrónica c.626+1G>A, fue descrita anteriormente y está ubicada en un sitio donador de *splicing* del intrón 5 de *EXT2*, aunque no se han realizado estudios predictivos para dicha mutación (Vink et al., 2004). A pesar de que en la literatura se

ha descrito que la mayoría de las mutaciones se han concentrado en los primeros exones de *EXT2* y postulan como casos excepcionales a la presencia de mutaciones en los nucleótidos ubicados en los últimos 6 exones (Wuyts & Van Hul, 2000; Wuyts et al., 1999; Jennes et al., 2009), este estudio coincide con otros en los cuales las mutaciones se encontraron localizadas en los últimos exones (Ciavarella et al., 2013; Jennes et al., 2009; Sarrión et al., 2013).

En la bibliografía ha sido descrito que pacientes con OM que presentaron grandes deleciones, duplicaciones y/o rearreglos medianos dentro de los genes *EXT1* y *EXT2*, las mismas no pudieron detectarse mediante amplificación por PCR y secuenciación sino por la metodología de ensayos de amplificación con sondas (MLPA). El uso de esta metodología permitió incrementar la detección de mutaciones en nuestros pacientes (Signori et al., 2007; Jennes et al., 2008; Pedrini et al., 2011; Stancheva-Ivanova et al., 2011). La deleción completa del exón 1 del gen *EXT1* detectada por MLPA en ADN<sub>g</sub> del P36, permitió considerar a este paciente, que presentaba un solo osteocondroma ubicado en la zona distal del fémur, dentro del grupo de pacientes con OM con un fenotipo muy moderado (Hameetmann et al., 2007).

Podemos afirmar que la metodología de PCR y secuenciación directa conjuntamente con la metodología de MLPA, han sido una herramienta fundamental para detectar 7 de 14 alelos mutantes no descritos anteriormente en *EXT1* y 4 de las 6 mutaciones encontradas en el gen *EXT2*. En los pacientes estudiados en este trabajo de tesis, no hemos encontrado mutaciones recurrentes a diferencia de algunos autores, como Ciavarella et al., 2013 que detectaron 15% de mutaciones recurrentes en ambos genes en pacientes italianos (Ciavarella et al., 2013). No obstante, Jennes et al., 2009 han reportado una baja recurrencia de mutaciones entre pacientes caucásicos, de Japón, Tunisia, Albania, India, y Estados Unidos que podría deberse a mutaciones independientes de cada población (Jennes et al., 2009). Estos resultados concuerdan con lo expresado en un trabajo anterior respecto a mutaciones no recurrentes en un 95% (n=37) de una población de 39 pacientes (Sarrión et al., 2013). Probablemente, el número de pacientes estudiados en estos cohortes es pequeño para llegar a conclusiones que permitan encontrar recurrencia de algunas mutaciones y posibles "hotspots" en nuestra población (Jennes et al., 2009; Sarrión et al., 2013; Ciavarella et al., 2013).

Existiría un 26% de los pacientes incluidos en este estudio, que han sido caracterizados como "pacientes OM sin definición genotípica" (Figura 22). En los mismos, no fueron identificadas hasta el momento las mutaciones causantes de las manifestaciones clínicas observadas. Se postulan varias hipótesis que podrían ser

sometidas a estudio como continuación de este trabajo de tesis y que son referidas a que las mutaciones podrían encontrarse en regiones que no han sido analizadas en los genes *EXT1* y *EXT2*, así como en zonas intrónicas muy profundas, en los extremos 5' ó 3', o en las secuencias UTR de ambos genes *EXT*. No obstante, el análisis en estas zonas del gen en estudios reportados con anterioridad, no han detectado mutaciones en estas regiones 5'UTR o 3'UTR (Lonie et al., 2006). En los pacientes con ausencia de mutaciones en ambos genes podría considerarse la existencia de alteraciones en otros genes posibles responsables de OM, incluyendo los genes de la familia *EXT-Like* (*EXTL1*, *EXTL2*, *EXTL3*) (Xu et al., 1999), así como genes involucrados en mecanismos de control de la osificación endocondral, como los de la familia sindecanos (*SDC2*, *SDC3*) y *PTHR1*, aunque no se lograron encontrar mutaciones en estos genes, por lo cual fueron descartados como genes candidatos de la patología en esa población estudiada (Lonie et al. 2006). Se ha propuesto un posible gen *EXT3* localizado en el brazo corto del cromosoma 19 para explicar la ausencia de un porcentaje pequeño de mutaciones en pacientes con OM ya que se encontró asociado por análisis de ligamiento (Le Merrer et al., 1994). Sin embargo, la existencia de ese tercer locus es aún desconocida (Ahn et al., 1995; Wuyts et al., 1996, Jennes et al., 2009). Otra hipótesis podría ser que los pacientes presenten mutaciones en zonas no codificantes de ambos genes *EXT* que comprometan la función de las proteínas *EXT*, así como la presencia de grandes deleciones en varios exones que no puedan identificarse mediante las metodologías empleadas en este estudio (Signori et al., 2007).

Otra posibilidad podría deberse a la presencia de polimorfismos en el sitio promotor de los genes *EXT* que comprometan la regulación de la expresión de ambos genes. Un estudio reciente describió un rol regulatorio para un polimorfismo G/C SNP (rs3401643) ubicado en la posición -1158 bp, dentro de un sitio de unión a un factor de transcripción USF1 en la secuencia del promotor del gen *EXT1* (Jennes et al., 2012). Estos autores observaron la presencia del alelo C resultaba en un incremento del ~56% en la actividad del promotor. En otro aspecto, se ha descrito que el patrón de metilación de los residuos citosina en la región promotora conduce a la represión de la transcripción en los genes supresores de tumores, sin embargo no parece ser el caso de los sitios promotores de los genes *EXT1* y *EXT2* en osteocondromas o condrosarcomas (Ropero et al., 2004; Hameetman et al., 2007; Jennes et al., 2009). Otra hipótesis podría ser que estos pacientes presenten mutaciones somáticas en el ADN proveniente de células de osteocondromas y no a partir del material más comúnmente analizado, los leucocitos (Jennes et al., 2009). Durante este estudio, al

no disponer de tejidos de osteocondromas obtenidos quirúrgicamente de todos los pacientes, no se pudo realizar la búsqueda de mutaciones somáticas en muestras de ADN de pacientes OM que no presentaron mutaciones en ambos genes *EXT* (26%) (n=7). Rearreglos intrónicos dentro del primer exón de *EXT1* que no podrían ser detectados con métodos convencionales de diagnóstico (Waaiker et al., 2013; Hueguel et al., 2013b) y translocaciones cromosómicas o incluso modificaciones post-traduccionales, fueron demostradas como mecanismos para el desarrollo de OM, para lo cual se deberían emplear otras metodologías diferentes a las utilizadas en este estudio para su detección (Hameetman et al., 2007; White et al., 2004). Otro aspecto que se debería tener en cuenta como hipótesis a la ausencia de mutaciones en ambos genes, es la posibilidad de alteraciones en sitios susceptibles a regulación epigenética, que si bien no modificarían la composición de los genes podrían estar afectando a su expresión; así como el efecto que podrían originar los micro-ARN produciendo inactivación de los genes *EXT* en ausencia de mutaciones (Jones, 2011).

La transformación maligna a condrosarcoma es la complicación más importante en OM. En nuestra cohorte de pacientes, P06 y P38 desarrollaron transformación maligna de osteocondroma a condrosarcoma secundario periférico, ambos en pelvis (Figura 18). Ha sido publicado una incidencia entre el 0,5-3% de la población de pacientes malignizados (Bovée, 2008), en nuestro estudio es muy pequeño el número de pacientes aún para poder calcular el porcentaje de incidencia en nuestra población. Si bien se ha descrito que mutaciones en *EXT1* son más frecuentes en casos de transformación maligna a condrosarcoma (Francannet et al., 2001; Porter et al., 2004), en nuestro estudio no hemos observado una relación entre la malignización del osteocondroma con el gen alterado, ya que P06 presentó una mutación en el exón 1 de *EXT1* (p.Leu283\*) que produce una proteína trunca en etapas iniciales del transcrito (Delgado et al., 2012), mientras que en P38 no se detectaron mutaciones en ambos genes *EXT*. Probablemente el número pequeño de pacientes estudiados en esta cohorte no permite hasta el momento llegar a conclusiones para evaluar una posible asociación entre malignización y alteraciones genéticas específicas en nuestra población (Tabla 9).

Hasta el momento, no existen tratamientos que prevengan el crecimiento de estos tumores y los pacientes sufren por lo menos una ó múltiples cirugías (Bovée et al 2008; Clement et al., 2011; Delgado et al., 2012). Se ha demostrado que los osteocondromas hereditarios y los condrosarcomas secundarios están asociados a un segundo *hit* mutacional en los genes *EXTs* (Bovée, 2010; Hecht et al., 1997). En este

sentido, hemos analizado esta posibilidad en ADN extraído de tejido obtenido quirúrgicamente de un condrosarcoma del P06. No se observaron mutaciones somáticas como segundo *hit* en ninguno de los 2 genes estudiados. El riesgo de la transformación maligna no ha sido asociado con mutaciones en los genes *EXT*, ni con variables como edad, sexo, severidad del fenotipo, número de lesiones, sino que se ha reportado que tiene una asociación más frecuente con el sitio anatómico de la lesión, ya que se produce principalmente en ciertos segmentos localizados en huesos planos (pelvis, omóplatos y parte proximal del fémur) (Alvarez et al., 2007; Pedrini et al., 2011). Esta observación coincide con lo descrito en ambos pacientes que presentaron malignización en grandes masas neoplásicas en pelvis (Figura 18). Además podría haber una correlación de los pacientes malignizados con la presencia de una historia familiar positiva (Figuras 20 y 21) (Pedrini et al., 2011).

Mutaciones que inactiven los genes *EXT1* y *EXT2* han sido reportadas como los eventos más comunes en pacientes con OM y resultan en la formación de proteínas *EXT1* ó *EXT2* no funcionales, con un grado de expresión variable en diferentes tejidos (Jennes et al., 2009; Lonie et al., 2006; Pedrini et al., 2005; Signori et al., 2007). En este estudio se han observado 11 mutaciones que producen codones de terminación prematuros, lo cual se traduce en un alto grado de severidad en los fenotipos clínicos analizados en los pacientes (Tabla 9). No obstante, es interesante destacar que en el análisis de la expresión en tejido de las proteínas *EXT1* y *EXT2*, en muestras de osteocondromas, nuestros resultados concuerdan con lo postulado por diferentes autores que hacen referencia a que la expresión del complejo hetero-oligomérico de las proteínas *EXT* en pacientes con OM ó OS estaría disminuido independientemente del gen afectado *EXT1* o *EXT2* (Mc Cormick et al., 2000, Bernard et al, 2001). En particular, se observó que P06, con osteocondromatosis múltiple y una transformación maligna de un osteocondroma de pelvis hacia un condrosarcoma, el análisis del fenotipo dio como resultado el mayor grado de severidad (IVS). El P06 presentó una mutación en *EXT1*(p.Leu283\*) y no evidenció mutaciones en el gen *EXT2* y al estudiar los niveles de expresión de ambas proteínas *EXT*, se observó que ninguna de las dos proteínas se expresaba en el tejido afectado. Este fenómeno, de presentar una mutación en el gen *EXT1*, también con pérdida en la expresión de la proteína *EXT2*, ha sido observado en otros pacientes que no presentan malignización a condrosarcoma (Figura 38) (Tabla 10). Por ejemplo, en P02 los niveles de expresión de ambas proteínas también se observaron muy disminuidos *EXT1* (11%) y *EXT2* (20%), respecto a los controles ensayados (Figura 38), este paciente con OM y fenotipo severo (IIS) presenta una mutación en el gen *EXT1* (p.Leu490ArgfsX9), sin

mutaciones detectadas en *EXT2* (Tabla 15). En P26, con OM y fenotipo moderado, no fueron detectadas mutaciones en *EXT1* o *EXT2*, y sin embargo presentó niveles de expresión disminuida de la proteína *EXT1* (50%) y muy disminuida de *EXT2* (10%) (Figura 38) (Tabla 15). Para este paciente se postula que podría presentar mutaciones en el sitio promotor de alguno de los genes *EXT*, o en sitios reguladores para la expresión génica. En el caso de los pacientes con OS (P07 y P31), que presentaron un sólo osteocondroma y en los cuales no es posible determinar el grado de severidad del fenotipo, los patrones de expresión de ambas proteínas *EXT* se observaron disminuidas a valores inferiores al 50%, excepto la proteína *EXT1* en P31, que disminuyó solamente un 30% respecto al control, a pesar de no haber sido detectada en ninguno de estos pacientes la mutación responsable. Esto podría deberse a que la proteína *EXT* alterada probablemente inactiva a la holoenzima completa, estimulando la degradación ó inhibiendo la expresión de la otra proteína *EXT*, así como interfiriendo en alguna función del Golgi por mecanismos aún no descritos para esta patología (Bernard et al., 2000). Podemos concluir en este estudio que la expresión del complejo de proteínas *EXT* en pacientes con OM ó OS se vio disminuida independientemente del gen afectado (*EXT1/EXT2*) (Bernard et al., 2001, Mc Cormick et al., 2000). Además, no se encontró asociación entre variables fenotípicas analizadas con los niveles de expresión de ambas proteínas (n=5) (Tabla 14).

Se han realizado múltiples estudios a nivel mundial para identificar la pérdida de heterocigocidad (*LOH*) mediante un segundo *hit* mutacional en los genes *EXT* de la cubierta cartilaginosa de los osteocondromas (Hameetmann et al., 2007). En algunos estudios se ha identificado un segundo *hit* o la disrupción somática del alelo funcional de los genes *EXT1* ó *EXT2* mediante DHPLC ó MLPA solo en una minoría de las muestras de osteocondromas (Zuntini et al., 2010). Este hecho podría deberse a otros mecanismos epigenéticos, postraduccionales, ó otros segundos *hits* que intervienen en la inactivación de los genes *EXT*, ó en la inactivación en las polimerasas de HS en los condrocitos. Se sugiere además, que un segundo *hit* podría ser la expresión de un único micro-ARN, ó un ARN pequeño no codificante, pero que desregula la expresión de un panel de genes. Se ha demostrado que los osteocondromas presentan un perfil de expresión de micro-ARN distintivo (Zuntini et al., 2010; Jones, 2011). La pérdida de heterocigocidad podría ser la explicación de los niveles bajos de HS, sin embargo se ha observado *LOH* solo en algunos casos (Bové et al., 1999). De este modo, es posible que mutaciones secundarias en otros genes relacionados a la síntesis y modificación de HS, a la acción de enzimas degradativas como la heparanasa ó otros

mecanismos participen en la reducción de los niveles de HS (Hueguet et al., 2013b; Trebicz-Geffen et al., 2008). En los pacientes en los cuales fue posible el análisis *LOH* durante este trabajo de tesis, no se observó la existencia de la pérdida del segundo alelo nativo o segundo *hit* de inactivación del alelo normal en *EXT1* o *EXT2* (Hameetman et al., 2007; Lüdecke et al., 1997; Hall et al., 2002; Jennes et al., 2009). Se sugiere que este resultado podría haber sido subestimado, debido a que ha sido descrita una naturaleza mixta de células dentro de los osteocondromas con la presencia de mosaicismo que podría estar representado en este caso, por una mayor proporción de condrocitos *wild-type* conjuntamente con una cantidad menor de condrocitos que presentan inactivación de los genes *EXT* (Jones, 2011).

Respecto al análisis de diferentes variables clínicas, fue descrito por diferentes autores que no es posible establecer si existe una asociación entre el genotipo encontrado y las manifestaciones fenotípicas analizadas en pacientes con osteocondromatosis, ya que hasta el momento no se han encontrado relaciones consistentes (Alvarez et al., 2006, 2007; Francannet et al., 2001; Leube et al., 2008; Porter et al., 2004; Wuyts et al., 2005; Jennes et al., 2008; Signori et al., 2007). Sin embargo, recientemente se ha publicado un estudio de asociación entre genotipo y fenotipo en un gran cohorte de pacientes con OM, en el cual se pudieron identificar algunas asociaciones evaluadas con un nuevo sistema de clasificación clínica (Pedrini et al., 2011). Si bien en este estudio no se observó una relación entre el grado de severidad fenotípica y el genotipo detectado, el fenotipo con mayor severidad clínica (IVS) se pudo observar en 4 pacientes (Figura 17) con presencia de mutaciones en los genes *EXT1* (grupo A) (P05, P06 y P29) y en *EXT2* (grupo B) (P12). No hemos encontrado pacientes del grupo C, es decir sin mutaciones detectadas, incluidos en la clasificación fenotípica de mayor severidad clínica (IVS) (Tablas 9 y 13). Algunos autores encontraron una asociación entre pacientes sin definición genotípica con fenotipos más leves lo cual podría ser coincidente con lo descrito para los pacientes de nuestro cohorte, ya que la mayoría de los pacientes de este grupo C presentaron un grado de severidad intermedia (IIS) (Tabla 13). Este hecho sugiere que mutaciones en los genes *EXT1* ó *EXT2* podrían ejercer un rol más importante en la progresión de la enfermedad, desarrollando el fenotipo de mayor severidad clínica (IVS) en comparación con pacientes que no presentaron mutaciones en ambos genes *EXT* (Pedrini et al., 2011). Sin embargo, no se encontró una asociación entre el fenotipo más severo (IVS) con respecto a la distribución de las mutaciones, ya que los pacientes con esta clasificación fenotípica presentaron una distribución aleatoria de

mutaciones en diferentes exones de los genes *EXT1* y *EXT2* (Tablas 8 y 13). Diferentes estudios han sugerido asociación de fenotipos de mayor severidad y mutaciones en el gen *EXT1* comparado con el gen *EXT2* (Alvarez et al., 2006, 2007; Francannet et al., 2001; Leube et al., 2008; Porter et al., 2004; Wuyts et al., 2005), mientras que otros estudios no pudieron confirmar esta observación (Jennes et al., 2008; Signori et al., 2007). Francannet et al., 2001 reportó una correlación significativa entre las mutaciones en los genes *EXT1* con fenotipo severo en pacientes con OM, específicamente con gran número de osteocondromas y baja estatura (Francannet, 2001). Otros autores reportaron las mismas observaciones, estableciendo además una correlación con deformidades esqueléticas (acortamiento o inclinamiento de antebrazos, o deformidades de rodillas) (Porter et al., 2004), y limitaciones funcionales (movimientos reducidos en el codo, antebrazos y/o rodillas) (Porter et al., 2004; Wuyts et al., 2005), acortamiento de las extremidades y afectación de huesos planos y pélvicos (Álvarez et al., 2006, 2007). En estudios realizados en ratones, se ha observado una disminución del crecimiento longitudinal y una expansión lateral del hueso debido a mutaciones en genes relacionados con la polaridad celular (genes frizzled (*Fzd*) (De Andrea & Hogendoorn, 2012). En relación a este hecho, mutaciones en genes diferentes a *EXT*, relacionados a la polaridad celular, podrían atribuir la presencia de baja estatura y deformidades observadas en pacientes con osteocondromatosis debido a una alteración en la estructura de las columnas longitudinales de condrocitos en la placa de crecimiento epifisiaria (De Andrea & Hogendoorn, 2012).

Se ha hipotetizado que las diferencias en el grado de severidad fenotípica podrían deberse a que la proteína *EXT1* posee una función glicosiltransferasa más activa, mientras que la proteína *EXT2* cumple un rol estructural dentro del complejo oligomérico exostosina interviniendo en el correcto funcionamiento de *EXT1* (Busse et al., 2007, Pedrini et al., 2011). Alteraciones en la proteína *EXT1* conducirían a la desorganización del crecimiento del cartílago desarrollando características clínicas de mayor severidad fenotípica, por ejemplo, el incremento del número de osteocondromas ó la disminución del percentil de altura (Jennes et al., 2009; Pedrini et al., 2011). Mutaciones en *EXT2* han sido asociadas con el fenotipo de menor severidad debido a que algunos estudios demostraron que la proteína *EXT2* no presentaría una actividad enzimática autónoma si no se encuentra acoplada a la proteína *EXT1* (Francannet et al., 2001; Wei et al., 2000). Sin embargo, se conoce que las características clínicas de osteocondromatosis son producidas debido a alteraciones en cualquiera de los dos genes *EXT*. Si bien se describieron mutaciones

en el gen *EXT1* y transformación maligna hacia condrosarcoma (Francannet et al., 2001; Porter et al., 2004), la severidad del fenotipo no demuestra ser un valor predictivo para la transformación maligna (Porter et al., 2004). Otros autores no pudieron confirmar las correlaciones descritas anteriormente (Jennes et al., 2008; Signori et al., 2007). Una gran variabilidad clínica ha sido descrita entre pacientes no relacionados pero que comparten la misma mutación e incluso variabilidad clínica intrafamiliar con la misma mutación (Alvarez et al., 2006; Francannet et al., 2001; Signori et al., 2007). Por lo tanto, está claro que existen factores adicionales más allá de las mutaciones primarias en los genes *EXT* que también contribuyen a las manifestaciones fenotípicas de la enfermedad (Jennes et al., 2009).

En resumen, entre las variables clínicas analizadas en los 3 grupos de pacientes: grupo A) pacientes que presentaron mutaciones en el gen *EXT1*, grupo B) pacientes que presentaron mutaciones en el gen *EXT2*, y grupo C) pacientes que no presentaron mutaciones en ambos genes; solamente fueron encontradas diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) con respecto a las siguientes variables: 1) presencia de lesiones en miembros inferiores ( $p = 0,0417$ ), 2) localización de lesiones en fémur ( $p = 0,0251$ ), y 3) localización de lesiones en escápula ( $p = 0,0396$ ). Con respecto a las tres variables clínicas anteriormente citadas se logró una mayor asociación con los pacientes que presentaron mutaciones en *EXT1* (Grupo A) (52% de los pacientes que presentaron lesiones en miembros inferiores, 57% de los pacientes con lesiones en fémur, y 60% de los pacientes con lesiones en escápula) (Figura 39).

En este cohorte de pacientes con OM ( $n = 27$ ) se ha observado mayor número de sexo masculino (59%) que de sexo femenino (41%), esto ha sido descrito con anterioridad por algunos autores (Wicklund et al., 1995; Legeai-Mallet et al., 1997; Francannet et al., 2001) Estas diferencias encontradas entre ambos sexos, podría deberse a la existencia de factores protectores o moduladores de la expresión fenotípica en mujeres, debido probablemente a las hormonas sexuales femeninas, factores modificadores relacionados al cromosoma X ó factores de crecimiento, que ocasionarían un fenotipo más leve o harían que incluso las manifestaciones clínicas de esta patología sean inadvertidas (Legeai-Mallet et al., 1997; Faiyaz-Ul-Haque et al., 2004; Stancheva- Ivanova et al., 2011) A pesar de la diferencia observada entre ambos sexos, no se encontraron diferencias significativas en el análisis de asociación entre el sexo y los 3 grupos de pacientes con OM analizados (A, B y C) ( $p = 0,0891$ ) ( $n = 27$ ) (Figura 40). Si bien en los grupos de pacientes que presentaron mutaciones en *EXT1* (grupo A) y mutaciones en *EXT2* (grupo B) se encontró una mayor proporción de pacientes de sexo masculino (57% y el 43% respectivamente), en el grupo de

pacientes que no presentaron mutaciones en ambos genes *EXT1-EXT2* (Grupo C) el mayor porcentaje de pacientes estuvo representado por el sexo femenino, pero estadísticamente estos valores no fueron significativos (Figura 40).

Los pacientes que no presentaron mutaciones en genes *EXT1-EXT2* (grupo C) iniciaron los síntomas de la enfermedad más tarde ( $7,4 \pm 4$  años de edad) con respecto a los pacientes que presentaron mutaciones en *EXT2* (grupo B) ( $0,6 \pm 0,6$  años de edad). Este hecho podría deberse a que mutaciones en los genes *EXT* tendrían un papel importante en el inicio de los síntomas clínicos en estos pacientes ( $p=0,005$ ) (Figura 41 A). Las demás variables clínicas analizadas (presencia de dolor, percentil de altura  $<10$ , escoliosis y deformidades de huesos no demostraron diferencias significativas que permitan una asociación entre los 3 grupos de pacientes estudiados (A, B y C) (Tabla 10).

En resumen, durante este estudio, no se logró evidenciar diferencias entre el grado de severidad del fenotipo observado y las mutaciones en los genes *EXT1* ó *EXT2* (Tabla 13). Es difícil de establecer una correlación genotipo-fenotipo en pacientes con OM ya que más del 77% de las alteraciones en los genes *EXT1* y *EXT2* corresponden a mutaciones privadas (Jennes et al., 2009). Podríamos encontrar una relación entre ciertos parámetros clínicos y mutaciones en el gen *EXT1*, como en el caso de la presencia de deformidades de huesos, escoliosis como fue descrito anteriormente en la bibliografía. Del mismo modo, los pacientes con ausencia de mutaciones en ambos genes *EXT* podrían presentar alteraciones en otros genes o involucrar ciertos mecanismos de señalización en el tejido atenuando la severidad fenotípica.

Con respecto al análisis estadístico de asociación entre el tipo de herencia (*de novo*, herencia materna o paterna) no se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos de pacientes analizados (A, B y C) ( $p=0,0891$ ). Se pudieron realizar algunas observaciones, ya que la mayoría de los pacientes OM presentó herencia familiar materna o paterna (solamente los pacientes del grupo A presentaron herencia materna, y los grupos B y C herencia paterna) (Tablas 9 y 11). En los pacientes con OM que presentaron herencia familiar, con fenotipo clínico caracterizado, estuvieron clasificados dentro del fenotipo severo (IS, IIS y IVS), mientras que en los pacientes que presentaron mutaciones "*de novo*" o esporádicas el fenotipo analizado fue moderado (Tabla 11). Este hecho podría coincidir con reportes anteriores, en los cuales se asocia a la herencia familiar con el fenómeno de anticipación, que produce un aumento en el grado de severidad fenotípica hacia las generaciones subsiguientes (Francannet et al., 2001). Además, en estudios previos, se reportó la presencia de

variabilidad intrafamiliar en las familias afectadas, mostrando un gradiente de severidad que va desde un fenotipo más leve en los padres hacia un fenotipo más severo en los hijos afectados coincidente también con el fenómeno de anticipación (Francannet et al., 2001; Pedrini et al., 2011). Hemos observado una diferencia en el grado de severidad entre los pacientes y otros miembros afectados de la familia. En 8 de las familias con confirmación diagnóstica molecular se observó herencia familiar, sólo en 2 familias se dispuso de los datos clínicos que permitieron valorar el fenotipo y se observó una progresión de la severidad en las distintas generaciones afectadas (P05y P06). Pedrini et al., 2011 postula que los hijos de sexo masculino tienen una tendencia a desarrollar fenotipos más severos que sus padres afectados, mientras que las hijas mujeres desarrollarían fenotipos más leves. Nuestros resultados no coinciden con lo postulado por Pedrini et al., 2011 ya que hemos observado un aumento en el grado de severidad fenotípica desde padres hacia hijos tanto de sexo femenino como masculino (Pedrini et al., 2011). De todos modos, nuestro tamaño muestral para realizar este análisis fue muy pequeño ( $n=2$ ) para poder observar variabilidad fenotípica familiar debido a una misma mutación.

# ***CONCLUSIONES***

Los resultados de este trabajo de tesis han contribuido a iniciar en nuestro país la investigación de los Desórdenes Congénitos de Glicosilación (CDG) debidos a alteraciones de la O-glicosilación con manifestaciones esqueléticas. La Osteocondromatosis Múltiple hereditaria (OM), denominada EXT1/EXT2-CDG, es actualmente la clase de CDG más frecuente a nivel mundial (1/18.000) (De Andrea & Hogendoorn, 2012).

- En una cohorte de pacientes Latinoamericanos con OM (n=27), se ha detectado el cambio genético en 20 pacientes, identificando mutaciones en los genes *EXT1* ó *EXT2* como responsables de esta patología, la mayoría de ellas no descritas anteriormente.

- No se detectaron alteraciones en los exones y zonas intrónicas flanqueantes en los genes *EXT1* y *EXT2* en 7 pacientes (26%) con OM.

- No se han identificado mutaciones en los pacientes con OS excepto en uno de ellos que a pesar de presentar una sola lesión detectable, la presencia de una mutación en ADN genómico, en el gen *EXT1* permitió incluirlo como un caso con OM con un fenotipo moderado.

- Fueron observadas alteraciones patogénicas en la estructura de la proteína EXT1 como consecuencia de mutaciones *missense* o intrónicas, mediante análisis bioinformáticos con programas de predicción.

- No se encontró pérdida de heterocigocidad específica de tejido (LOH) en ADN extraído de muestras obtenidas de osteocondromas de pacientes con osteocondromatosis múltiple o solitaria, ni en un paciente malignizado.

- Se ha detectado una reducción en los niveles de expresión del complejo de proteínas EXT1 y EXT2, analizadas en muestras de tejido de osteocondromas de pacientes con OM ó OS, independientemente del gen afectado *EXT1* o *EXT2*, o sin mutación detectada.

- No se ha podido establecer una asociación estadísticamente significativa entre el grado de severidad con respecto al gen mutado ni al tipo de mutación encontrada.

- Se ha detectado una asociación estadísticamente significativa en el análisis de las variables fenotípicas respecto a la presencia de lesiones en miembros inferiores, en fémur y en escápula, en pacientes con mutaciones en *EXT1*.

- Se ha descrito que mutaciones en *EXT1* estarían asociadas a variables clínicas compatibles con mayor severidad fenotípica, lo cual podría deberse a que la proteína *EXT1* presenta una mayor actividad enzimática con respecto a *EXT2* que cumpliría más bien un rol estructural dentro del complejo EXT (Francannet et al., 2001; Porter et al., 2004).

-En conclusión, nuevos estudios son necesarios respecto a profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de OM, ya que numerosas hipótesis surgen respecto a alteraciones en nuevos genes candidatos relacionados a esta patología. Probablemente la metodología de secuenciación exómica provea en un futuro las herramientas necesarias para su pronta identificación.

# ***BIBLIOGRAFÍA***

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7(4),248-9.
- Ai X, Kitazawa T, Do AT, Kusche-Gullberg M, Labosky PA, Emerson CP. (2007). SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation. *Development*;134(18),3327-38.
- Ahn J, Lüdecke HJ, Lindow S, Horton WA, Lee B, Wagner MJ, Horsthemke B, Wells DE. (1995). Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet.*, 11(2),137-143.
- Allen BL & Rapraeger AC.(2003). Spatial and temporal expression of heparan sulfate in mouse development regulates FGF and FGF receptor assembly. *J Cell Biol.*, 163(3), 637-48.
- Alman B. (2009). Multiple hereditary exostosis and hedgehog signaling: implications for novel therapies. *J Bone Joint Surg Am.*, 91(4),63-7.
- Alvarez CM, De Vera MA, Heslip TR, Casey B. (2007). Evaluation of the anatomic burden of patients with hereditary multiple exostoses. *Clin Orthop Relat Res.*,462,73-9.
- Alvarez C, Tredwell S, De Vera M, Hayden M. (2006). The genotype-phenotype correlation of hereditary multiple exostoses. *Clin Genet.*, 70(2), 122-30.
- Artuch R, Ferrer L, Pineda J, Moreno J, Busquets C, Briones P, Vilaseca MA. (2003). Western blotting with diaminobenzidine detection for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *J Neurosci Methods*, 125(1-2), 167-171.
- Aszodi A, Hunziker EB, Brakebusch C, Fässler R. (2003). Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.*, 17(19), 2465-79.
- Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. (2011). A continuum model for tumour suppression. *Nature*, 476(7359), 163-9.
- Bernard MA, Hall CE, Hogue DA, Cole WG, Scott A, Snuggs MB, Clines GA, Lüdecke HJ, Lovett M, Van Winkle WB, Hecht JT. (2001). Diminished levels of the putative tumor suppressor proteins EXT1 and EXT2 in exostosis chondrocytes. *Cell Motil Cytoskel*, 48(2), 149-62.
- Bertoni F, Bacchini P and Hogendoorn PCW. Chondrosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK and Mertens F (eds). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. IARC Press, Lyon 2002.
- Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 446(7139), 1030-7.
- Bovée JVMG. (2002) *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.6(3), 232-235.
- Bovée JVMG, Hameetman L, Kroon HM, Aigner T, Hogendoorn PCW. (2006). EXT-related pathways are not involved in the pathogenesis of dysplasia epiphysealis hemimelica and metachondromatosis. *J Pathol*, 209(3), 411-9.
- Bovée JV, Cleton-Jansen AM, Wuyts W, Caethoven G, Taminiau AH, Bakker E, Van Hul W, Cornelisse CJ, Hogendoorn PC. (1999). EXT-mutation analysis and loss of heterozygosity in sporadic and hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcomas. *Am J Hum Genet.*, 65(3), 689-98.

- Bovée JVMG. (2008). Multiple osteochondromas. *Orphanet J Rare Dis.* 3, 3.
- Bovée JVMG. (2010). EXTra hit for mouse osteochondroma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(5), 1813-4.
- Bovée JV, Hogendoorn PC, Wunder JS, Alman BA. (2010). Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*; 10(7):481-8.
- Bovée JV MG & Hogendoorn PCW. (2010). Molecular pathology of sarcomas: concepts and clinical implications. *Virchows Arch.* 456(2), 193-9.
- Briones P, Vilaseca MA, Schollen E, Ferrer I, Maties M, Busquets C, Artuch R, Gort L, Marco M, van Schaftingen E, Matthijs G, Jaeken J, Chabás A. (2002). Biochemical and molecular studies in 26 Spanish patients with congenital disorder of glycosylation type Ia. *J Inherit Metab Dis.*, 25(8), 635-46.
- Busse M, Feta A, Presto J, Wilén M, Grønning M, Kjellén L, Kusche-Gullberg M. (2007). Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *J. Biol. Chem.*, 282(45), 32802-10.
- Campbell J & Kaplan F. (1992). Orthopedic Surgical Forum The Role of Morphogens in Endochondral Ossification T3qT. *Calcif Tissue Int.*, 50, 283-289.
- Carlsson P, Presto J, Spillmann D, Lindahl U, Kjellén L. (2008). Heparin/heparan sulfate biosynthesis: processive formation of N-sulfated domains. *J. Biol. Chem.*, 283(29), 20008-14.
- Cartegni L. (2003). ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.*, 31(13), 3568-3571.
- Cheillan D, Cognat S, Dorche C, Jaeken J, Vianey-Saban C, Guffon N. (2004). CDG IIx with unusual phenotype. *J Inherit Metab Dis*, 27(1), 103-104.
- Chen S, Wassenhove-McCarthy DJ, Yamaguchi Y, Holzman LB, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, Wijnhoven TJ, Woods AC, McCarthy KJ. (2008). Loss of heparan sulfate glycosaminoglycan assembly in podocytes does not lead to proteinuria. *Kidney Int.*, 74(3), 289-99.
- Ciavarella M, Coco M, Baorda F, Stanziale P, Chetta M, Bisceglia L, Palumbo P, Bengala M, Raiteri P, Silengo M, Caldarini C, Facchini R, Lala R, Cavaliere ML, De Brasi D, Pasini B, Zelante L, Guarnieri V, 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.
- Clement ND, Ng CE, Porter DE. (2011). Shoulder exostoses in hereditary multiple exostoses: probability of surgery and malignant change. *J Shoulder Elbow Surg.* 20(2), 290-4.
- Clines G, Ashley J, Shah S. (1997). The Structure of the Human Multiple Exostoses 2 Gene and Characterization of Homologs in Mouse and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res.* 7(4):359-67.
- Coman D, Irving M, Kannu P, Jaeken J, Savarirayan R. (2008). The skeletal manifestations of the congenital disorders of glycosylation. *Clin Genet.*, 73(6), 507-15.
- Cook A, Raskind W, Blanton SH, Pauli RM, Gregg RG, Francomano CA, Puffenberger E, Conrad EU, Schmale G, Schellenberg G, Wijsman E, Hecht JT, Wells D, Wagner MJ. (1993).

Genetic heterogeneity in families with hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet.*,53(1), 71-9.

Darilek S, Wicklund C, Novy D, Scott A, Gambello M, Johnston D, Hecht J. (2005). Hereditary multiple exostosis and pain. *J Pediatr Orthoped.*, 25(3), 369-76.

De Andrea CE, Wiweger MI, Bovée JVMG, Romeo S, Hogendoorn PCW. (2012). Peripheral chondrosarcoma progression is associated with increased type X collagen and vascularisation. *Virchows Archiv.*, 460(1), 95-102.

De Andrea CE, Wiweger M, Prins F, Bovée JVMG, Romeo S, Hogendoorn PCW. (2010). Primary cilia organization reflects polarity in the growth plate and implies loss of polarity and mosaicism in osteochondroma. *Lab Invest.*, 90(7), 1091-101.

De Andrea CE & Hogendoorn PCW. (2012). Epiphyseal growth plate and secondary peripheral chondrosarcoma : the neighbours matter. *J Pathol.*, 226(2):219-28.

Den Dunnen JT, Antonarakis SE. (2000). Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.*, 15(1), 7-12.

Delgado MA, Sarrión P, Azar N, Zecchini L, Robledo HH, Segura F, Balcells S, Grinberg D, Dodelson de Kremer R, Asteggiano CG. (2012). A Novel Nonsense Mutation of the EXT1 Gene in an Argentinian Patient with Multiple Hereditary Exostoses, *J Bone Joint Surg Am.*, 76(1), 1-6.

Delgado MA; Martinez-Domenech G; Sarrión P; Urreizti R; Zecchini L; Robledo HH; Segura F; Dodelson de Kremer R; Balcells S; Grinberg D; Asteggiano C.G.(2014). A Broad Spectrum of Genomic Changes in Latin American Patients with EXT1/EXT2-CDG. *Sci Rep.,In Press*,

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.*, 37(9), e67.

Dobson-Stone C, Cox RD, Lonie L, Southam L, Fraser M, Wise C, Bernier F, Hodgson S, Porter DE, Simpson AH, Monaco AP. (2000). Comparison of fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis and denaturing high-performance liquid chromatography for detection of EXT1 and EXT2 mutations in hereditary multiple exostoses. *Eur J Hum Genet.*,8(1), 24-32.

Duncan G, McCormick C, Tufaro F. (2001).The link between heparan sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the EXT family of putative tumor suppressor proteins. *J Clin Invest.*,108(4), 511–516.

Esko J D & Lindahl U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate, *J Clin Invest.* 108(2), 169-173.

Faiyaz-UI-Haque M, Zaidi SH, Al-Ali M, Al-Mureikhi MS, Kennedy S, Al-Thani G, Tsui LC, Teebi AS. (2004). A novel missense mutation in the galactosyltransferase-I (B4GALT7) gene in a family exhibiting facioskeletal anomalies and Ehlers-Danlos syndrome resembling the progeroid type. *Am J Med Genet.*, 128A(1), 39-45.

Fokkema IFAC, den Dunnen JT, Taschner PEM. (2005). LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach. *Hum Mutat.*, 26(2), 63-8.

- Francannet C, Merrer ML, Munnich A, Bonaventure J. (2001). Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses. *J Med Genet.*, 38, 430 - 434.
- Frank C, Eyaid W, Berger E, Aebi M. (2004). Identification and Functional Analysis of a Defect in the Human ALG9 Gene: Definition of Congenital Disorder of Glycosylation Type II. *J Hum Genet.*, 75, 146-150.
- Fux L, Feibish N, Cohen-Kaplan V, Gingis-Velitski S, Feld S, Geffen C, Vlodavsky I, Ilan N. (2009). Structure-function approach identifies a COOH-terminal domain that mediates heparanase signaling. *Cancer Res.*, 69(5):1758-67.
- Gallagher J & Lyon M. (1986). Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem J.*, 236, 313-325.
- Garner OB, Yamaguchi Y, Esko JD, Videm V. (2008). Small changes in lymphocyte development and activation in mice through tissue-specific alteration of heparan sulphate. *Immunology*, 125(3), 420-9.
- Gigante M1, Matera MG, Seripa D, Izzo AM, Venanzi R, Giannotti A, Digilio MC, Gravina C, Lazzari M, Monteleone G, Monteleone M, Dallapiccola B, Fazio VM. (2001). Ext-mutation analysis in Italian sporadic and hereditary osteochondromas. *Int J Cancer.*, 95(6), 378-83.
- Hall CR, Cole WG, Haynes R, Hecht JT. (2002). Reevaluation of a genetic model for the development of exostosis in hereditary multiple exostosis. *Am J Med Genet.*, 112(1), 1-5.
- Hallor KH, Staaf J, Bovée JV, Hogendoorn PC, Cleton-Jansen AM, Knuutila S, Savola S, Niini T, Brosjö O, Bauer HC, Vult von Steyern F, Jonsson K, Skorpil M, Mandahl N, Mertens F. (2009). Genomic profiling of chondrosarcoma: chromosomal patterns in central and peripheral tumors. *Clin Cancer Res.*, 15(8), 2685-94.
- Hameetman L, Bovée JV, Taminiau AH, Kroon HM, Hogendoorn PC. (2004). Multiple osteochondromas: clinicopathological and genetic spectrum and suggestions for clinical management. *Hered Cancer Clin Pract.*, 2(4), 161-73.
- Hameetman L, David G, Yavas A, White SJ, Taminiau AH, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC, Bovée JV. (2007). Decreased EXT expression and intracellular accumulation of heparan sulphate proteoglycan in osteochondromas and peripheral chondrosarcomas. *J. Pathol.*, 211(4), 399-409.
- Hardingham TE & Fosang AJ. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.*, 6(3):861-70.
- Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouzé P, Brunak S. (1996). Splice site prediction in Arabidopsis thaliana pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res.*, 24(17), 3439-52.
- Hecht JT, Hogue D, Wang Y, Blanton SH, Wagner M, Strong LC, Raskind W, Hansen MF, Wells D. (1997). Hereditary multiple exostoses (EXT): mutational studies of familial EXT1 cases and EXT-associated malignancies. *Am J Hum Genet.*, 60(1), 80-6.
- Hecht JT, Hogue D, Strong LC, Hansen MF, Blanton SH, Wagner M. (1995). Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome II and loss of heterozygosity for EXT-linked markers on chromosomes II and 8. *Am J Hum Genet.*, 56(5), 1125.

- Helenius A & Aebi M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 1019-49.
- Hennekam RC. (1991). Hereditary multiple exostoses. *Radiography*, 262-266.
- Hennet T. (2012). Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1820(9):1306-17.
- Hilton MJ, Gutiérrez L, Martinez DA, Wells DE. (2005). EXT1 regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral bone development. *Bone*, 36(3), 379-86.
- Holmborn K, Habicher J, Kasza Z, Eriksson AS, Filipek-Gornjok B, Gopal S, Couchman JR, Ahlberg PE, Wiweger M, Spillmann D, Kreuger J, Ledin J. (2012). On the roles and regulation of chondroitin sulfate and heparan sulfate in zebrafish pharyngeal cartilage morphogenesis. *J Biol Chem.*, 287(40), 33905-16.
- Huegel J, Mundy C, Sgariglia F, Nygren P, Billings PC, Yamaguchi Y, Koyama E, Pacifici M. (2013a). Perichondrium phenotype and border function are regulated by Ext1 and heparan sulfate in developing long bones: a mechanism likely deranged in Hereditary Multiple Exostoses. *Dev Biol.*, 377(1), 100-12.
- Huegel J, Sgariglia F, Enomoto-Iwamoto M, Koyama E, Dormans JP, Pacifici M. (2013b). Heparan sulfate in skeletal development, growth, and pathology: the case of hereditary multiple exostoses. *Dev Dyn.*, 242(9), 1021-32.
- Häcker U, Nybakken K, Perrimon N. (2005). Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 6(7), 530-41.
- Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. (2006). Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.*, 38(12):2018-39.
- Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y. (2003). Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science*. 302(5647), 1044-6.
- Iwao K, Inatani M, Matsumoto Y, Ogata-Iwao M, Takihara Y, Irie F, Yamaguchi Y, Okinami S, Tanihara H. (2009). Heparan sulfate deficiency leads to Peters anomaly in mice by disturbing neural crest TGF- $\beta$  2 signaling. *J Clin Invest.*, 119(7), 1997-2008.
- Iwao K, Inatani M, Ogata-Iwao M, Yamaguchi Y, Okinami S, Tanihara H. (2010). Heparan sulfate deficiency in periocular mesenchyme causes microphthalmia and ciliary body dysgenesis. *Exp Eye Res.*, 90(1), 81-8.
- Jaeken, J. (2003). Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it! *J Inherit Metab Dis.*, 26(2-3), 99-118.
- Jaeken, J. (2010). Congenital Disorders of Glycosylation. *Ann NY Acad Sci.*, 1214, 190-198.
- Jaeken, J. (2011). Congenital Disorders of Glycosylation (CDG): it's (nearly) all in it! *J Inherit Metab Dis*, 34(4), 853-8.
- Jaeken J1, Hennet T, Matthijs G, Freeze HH. (2009). CDG nomenclature: time for a change. *Biochim Biophys Acta*, 1792(9), 825-826.

- Jennes I, Entius MM, Van Hul E, Parra A, Sangiorgi L, Wuyts W. (2008). Mutation screening of EXT1 and EXT2 by denaturing high-performance liquid chromatography, direct sequencing analysis, fluorescence in situ hybridization, and a new multiplex ligation-dependent probe amplification probe set in patients with multiple osteochondromas. *J Mol Diagn.*, 10(1), 85-92.
- Jennes I, Pedrini E, Zuntini M, Mordenti M, Balkassmi S, Asteggiano CG, Casey B, Bakker B, Sangiorgi L, Wuyts W. (2009). Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MOdb). *Hum Mutat.*, 30(12), 1620-7.
- Jennes I, Zuntini M, Mees K, Palagani A, Pedrini E, De Cock G, Fransen E, Vanden Berghe W, Sangiorgi L, Wuyts W. (2012). Identification and functional characterization of the human EXT1 promoter region. *Gene*, 492(1), 148-59.
- Jones KB. (2011). Glycobiology and the growth plate: current concepts in multiple hereditary exostoses. *J Pediatr Orthop.*, 31(5), 577-86.
- Jones KB, Piombo V, Searby C, Kurriger G, Yang B, Grabellus F, Roughley PJ, Morcuende JA, Buckwalter JA, Capecchi MR, Vortkamp A, Sheffield VC. (2010). A mouse model of osteochondromagenesis from clonal inactivation of Ext1 in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(5), 2054-9.
- Karplus K, Barrett C, Hughey R. (1998). Hidden Markov models for detecting remote protein homologies. *Bioinformatics* 14, 846-856.
- Kelley LA, Sternberg MJ. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc.*, 4(3), 363-71.
- Kirn-Safran CB1, Gomes RR, Brown AJ, Carson DD. (2004). Heparan sulfate proteoglycans: coordinators of multiple signaling pathways during chondrogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 72(1), 69-88.
- Kitagawa H, Egusa N, Tamura JI, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Sugahara K. (2001). rib-2, a *Caenorhabditis elegans* homolog of the human tumor suppressor EXT genes encodes a novel alpha1,4-N-acetylglucosaminyltransferase involved in the biosynthetic initiation and elongation of heparan sulfate. *J Biol Chem.*, 276(7), 4834-8.
- Kitsoulis P, Galani V, Stefanaki K, Paraskevas G, Karatzias G, Agnantis NJ, Bai M. (2008). Osteochondromas: review of the clinical, radiological and pathological features. *In vivo*, 22(5), 633-46.
- Kivioja A1, Ervasti H, Kinnunen J, Kaitila I, Wolf M, Böhling T. (2000). Chondrosarcoma in a family with multiple hereditary exostoses. *J Bone Joint Surg Br.*, 82(2), 261-6.
- Knudson AG Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68(4), 820-3.
- Kojima H1, Wada T, Seki H, Kubota T, Wakui K, Fukushima Y. (2008). One third of Japanese patients with multiple osteochondromas may have mutations in genes other than EXT1 or EXT2. *Genet Test.*, 12(4), 557-61.
- Koziel L, Kunath M, Kelly OG, Vortkamp A. (2004). Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev Cell.*, 6(6), 801-13.
- Kreuger J & Kjellén L. (2012). Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability. *J Histochem Cytochem.*, 60(12), 898-907.

- Kronenberg HM. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423(6937), 332-6.
- Kucharzewska, P., Welch, J. E., Birgersson, J., & Belting, M. (2010). Establishment of heparan sulphate deficient primary endothelial cells from EXT-1(flox/flox) mouse lungs and sprouting aortas. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*,46(7), 577-84.
- Legeai-Mallet L, Munnich A, Maroteaux P, Le Merrer M. (1997). Incomplete penetrance and expressivity skewing in hereditary multiple exostoses. *Clin Genet.*;52(1):12-6.
- Leube B, Hardt K, Portier S, Westhoff B, Jäger M, Krauspe R, Royer-Pokora B. (2008). Ulna/height ratio as clinical parameter separating EXT1 from EXT2 families? *Genet Test.*, 12(1):129-33.
- Le Merrer M, Legeai-Mallet L, Jeannin PM, Horsthemke B, Schinzel A, Plauchu H, Toutain A, Achard F, Munnich A, Maroteaux P. (1994). A gene for hereditary multiple exostoses maps to chromosome 19p. *Hum Mol Genet.*,3(5), 717-22.
- Lin X, Wei G, Shi Z, Dryer L, Esko JD, Wells DE, Matzuk MM. (2000). Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol.*, 224(2), 299-311.
- Lind T, Tufaro F, McCormick C, Lindahl U, Lidholt K. (1998). The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem.*,273(41), 26265-8.
- Lonie L, Porter DE, Fraser M, Cole T, Wise C, Yates L, Wakeling E, Blair E, Morava E, Monaco AP, Ragoussis J. (2006). Determination of the mutation spectrum of the EXT1/EXT2 genes in British Caucasian patients with multiple osteochondromas, and exclusion of six candidate genes in EXT negative cases. *Hum Mutat.*, 27(11), 1160.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ.(1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*;193(1):265-75.
- Lüdecke HJ1, Ahn J, Lin X, Hill A, Wagner MJ, Schomburg L, Horsthemke B, Wells DE. (1997). Genomic organization and promoter structure of the human EXT1 gene. *Genomics*, 40(2), 351-4.
- Marklová E & Albahri Z. (2007). Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chim Acta*, 385(1-2), 6–20.
- Martinez-Duncker I, Asteggiano C & Freeze HH. (2012). Congenital Disorders of Glycosylation, Glycans: Biochemistry, Characterization and Applications, Hector Manuel Mora-Montes Chapter: Scientific Publications by Nova Science Publishers, Series: Biochemistry Research Trends. 59-81.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(24), 10932-10937.
- McCormick C, Leduc Y, Martindale D, Mattison K, Esford LE, Dyer AP, Tufaro F. (1998). The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nat genetics*, 19(2), 158-61.
- McCormick C, Duncan G, Goutsos KT, Tufaro F. (2000). The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(2), 668-73.

- Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. (2001). BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*, 128(22), 4523-34.
- Mohseny AB & Hogendoorn PC (2011). Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem cells*, 29(3), 397-403.
- Morava E, Wosik H, Kárteszi J, Guillard M, Adamowicz M, Sykut-Cegielska J, Hadzsiev K, Wevers RA, Lefeber DJ. (2008). Congenital disorder of glycosylation type Ix: review of clinical spectrum and diagnostic steps. *J Inherit Metab Dis*. 31(3), 450-6.
- Nadanaka S & Kitagawa H. (2008). Heparan sulphate biosynthesis and disease. *J Biochem*, 144(1), 7-14.
- Ornitz DM, Marie PJ. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.*, 16(12), 1446-65.
- Ornitz DM. (2005). FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16(2), 205-213.
- Ohtsubo K & Marth JD. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126(5), 855-67.
- Oshiro Y, Chaturvedi V, Hayden D, Nazeer T, Johnson M, Johnston DA, Ordóñez NG, Ayala AG, Czerniak B. (1998). Altered p53 is associated with aggressive behavior of chondrosarcoma: a long term follow-up study. *Cancer*, 83(11), 2324-34.
- Passanise AM, Mehlman CT, Wall EJ, et al (2011). Radiographic evidence of regression of a solitary osteochondroma: a report of 4 cases and a literature review. *J Pediatr Orthop.*, 31: 312–316.
- Pedrini E, De Luca A, Valente EM, Maini V, Capponcelli S, Mordenti M, Mingarelli R, Sangiorgi L, Dallapiccola B. (2005). Novel EXT1 and EXT2 mutations identified by DHPLC in Italian patients with multiple osteochondromas. *Hum Mutat.*, 26(3), 280.
- Pedrini E, Jennes I, Tremosini M, Milanesi A, Mordenti M, Parra A, Sgariglia F, Zuntini M, Campanacci L, Fabbri N, Pignotti E, Wuyts W, Sangiorgi L. (2011). Genotype-phenotype correlation study in 529 patients with multiple hereditary exostoses: identification of "protective" and "risk" factors. *J Bone Joint Surg Am.*, 93(24), 2294-302.
- Philippe C, Porter DE, Emerton ME, Wells DE, Simpson AH, Monaco AP. (1997). Mutation screening of the EXT1 and EXT2 genes in patients with hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet.*, 61(3), 520-8.
- Porter DE, Lonie L, Fraser M, Dobson-Stone C, Porter JR, Monaco AP, Simpson AH. (2004). Severity of disease and risk of malignant change in hereditary multiple exostoses. *J Bone Joint Surg Br.*, 86(7), 1041-1046.
- Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, Aung Z, Matza M, Merckenschlager M, Lin C, Rommens JM, Scadden DT. (2010). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*, 464(7290), 852-7.
- Raskind WH, Conrad EU, Chansky H, Matsushita M. (1995). Loss of heterozygosity in chondrosarcomas for markers linked to hereditary multiple exostoses loci on chromosomes 8 and 11. *Am J Hum Genet.*, 56(5), 1132-9.

- Reijmers RM1, Groen RW, Rozemuller H, Kuil A, de Haan-Kramer A, Csikós T, Martens AC, Spaargaren M, Pals ST. (2010). Targeting EXT1 reveals a crucial role for heparan sulfate in the growth of multiple myeloma. *Blood*, 115(3), 601-4.
- Reijnders C Hameetman L & Bovée J.(2011). Bone: Osteochondroma. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*, 13(9), 678-680.
- Roach JW, Klatt JW, Faulkner ND. (2009). Involvement of the spine in patients with multiple hereditary exostoses. *J Bone Joint Surg Am.*, 91(8), 1942-8.
- Roehl HH & Pacifici M. (2010). Shop talk: Sugars, bones, and a disease called multiple hereditary exostoses. *Dev Dyn.*, 239(6), 1901-4.
- Ropero S, Setien F, Espada J, Fraga MF, Herranz M, Asp J, Benassi MS, Franchi A, Patiño A, Ward LS, Bovee J, Cigudosa JC, Wim W, Esteller M. (2004). Epigenetic loss of the familial tumor-suppressor gene exostosin-1 (EXT1) disrupts heparan sulfate synthesis in cancer cells. *Hum Mol Genet.*, 13(22), 2753-65.
- Rubin LL & de Sauvage FJ. (2006). Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.*, 5(12), 1026-33.
- Sandell LJ. (2009). Multiple hereditary exostosis, EXT genes, and skeletal development. *J Bone Joint Surg Am.*, 91(4), 58-62.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(12), 5463-5467.
- Sarrión P, Sangorrin A, Urreiziti R, Delgado A, Artuch R, Martorell L, Armstrong J, Anton J, Torner F, Vilaseca MA, Nevado J, Lapunzina P, Asteggiano CG, Balcells S, Grinberg D. (2013). Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in Spanish patients with multiple osteochondromas. *Sci Rep.*, 3, 1346.
- Schmale GA, Conrad EU 3rd, Raskind WH. (1994). The natural history of hereditary multiple exostoses of Hereditary, *J Bone Joint Surg Am.*, 76(7):986-92.
- Schrage YM, Hameetman L, Szuhai K, Cleton-Jansen AM, Taminiau AH, Hogendoorn PC, Bovée JV. (2009). Aberrant heparan sulfate proteoglycan localization, despite normal exostosin, in central chondrosarcoma. *Am J Pathol.*, 174(3), 979-88.
- Schwartz HS, Zimmerman NB, Simon MA, Wroble RR, Millar EA, Bonfiglio M. (1987).The malignant potential of enchondromatosis. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 69, 269–274.
- Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*,7(8), 575-6.
- Selleck S. (2000). Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet.*, 16(5), 206-212.
- Senay C, Lind T, Muguruma K, Tone Y, Kitagawa H, Sugahara K, Lidholt K, Lindahl U, Kusche-Gullberg M. (2000). The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis. *EMBO Rep.*, 1(3), 282-6.
- Shi X & Zaia J. (2009). Organ-specific heparan sulfate structural phenotypes. *J Biol Chem.*, 284(18), 11806-14.

- Signori E, Massi E, Matera MG, Poscente M, Gravina C, Falcone G, Rosa MA, Rinaldi M, Wuyts W, Seripa D, Dallapiccola B, Fazio VM. (2007). A combined analytical approach reveals novel EXT1/2 gene mutations in a large cohort of Italian multiple osteochondromas patients. *Genes Chromosomes Cancer*, 46(5), 470–477.
- Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR. (2006). An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet.*, 15(16), 2490-508.
- Spiro MJ & Spiro RG. (2000). Use of recombinant endomannosidase for evaluation of the processing of N-linked oligosaccharides of glycoproteins and their oligosaccharide-lipid precursors. *Glycobiology*, 10(5), 521-9.
- Stancheva-Ivanova MK, Wuyts W, van Hul E, Radeva BI, Vazharova RV, Sokolov TP, Vladimirov BY, Apostolova MD, Kremensky IM. (2011). Clinical and molecular studies of EXT1/EXT2 in Bulgaria. *J Inherit Metab Dis.*, 34(4), 917-21.
- Stickens D, Clines G, Burbee D, Ramos P, Thomas S, Hogue D, Hecht JT, Lovett M, Evans GA. (1996). The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *NatGenet.*, 14(1), 25-32.
- Stieber JR & Dormans JP. (2005). Manifestations of hereditary multiple exostoses. *J Am Acad Orthop Surg.*13(2), 110-20.
- Takei Y, Ozawa Y, Sato M, Watanabe A, Tabata T. (2004). Three Drosophila EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Development*, 131(1), 73-82.
- Trebicz-Geffen M, Robinson D, Evron Z, Glaser T, Fridkin M, Kollander Y, Vlodavsky I, Ilan N, Law KF, Cheah KS, Chan D, Werner H, Nevo Z. (2008). The molecular and cellular basis of exostosis formation in hereditary multiple exostoses. *Int J Exp Pathol.*, 89(5), 321-31.
- Varki A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*,3(2), 97-130.
- Vink GR, White SJ, Gabelic S, Hogendoorn PC, Breuning MH, Bakker E. (2005). Mutation screening of EXT1 and EXT2 by direct sequence analysis and MLPA in patients with multiple osteochondromas: splice site mutations and exonic deletions account for more than half of the mutations. *Eur J Hum Genet.*,13(4), 470-4.
- Waaijer CJ, Winter MG, Reijnders CM, de Jong D, John Ham S, Bovée JV, Szuhai K. (2013). Intronic deletion and duplication proximal of the EXT1 gene: a novel causative mechanism for multiple osteochondromas. *Genes ChromosomesCancer*, 52(4):431-6.
- Wei G, Bai X, Gabb MM, Bame KJ, Koshy TI, Spear PG, Esko JD. (2000). Location of the glucuronosyltransferase domain in the heparan sulfate copolymerase EXT1 by analysis of Chinese hamster ovary cell mutants. *J Biol Chem.*, 275(36), 27733-40.
- White S & Sterrenburg E. (2003). An alternative to FISH: detecting deletion and duplication carriers within 24 hours.*J Med Genet.*, 40(10):e113.
- Wicklund CL, Pauli RM, Johnston D, Hecht JT. (1995). Natural history study of hereditary multiple exostoses. *Am J Med Genet.*, 55(1):43-6.

- Wise CA, Clines GA, Massa H, Trask BJ, Lovett M. (1997). Identification and localization of the gene for EXTL, a third member of the multiple exostoses gene family. *Genome Res.*, 7(1), 10-16.
- Wopereis S, Grünewald S, Huijben KM, Morava E, Mollicone R, van Engelen BG, Lefeber DJ, Wevers RA. (2007). Transferrin and Apolipoprotein C-III Isofocusing Are Complementary in the Diagnosis of N- and O-Glycan Biosynthesis Defects. *Clin Chem.*, 53(2):180-7.
- Wopereis S, Grünewald S, Morava E, Penzien JM, Briones P, García-Silva MT, Demacker PN, Huijben KM, Wevers RA. (2003). Apolipoprotein C-III Isofocusing in the Diagnosis of Genetic Defects in O-Glycan Biosynthesis. *Clin Chem.*, 1845(11), 1839-1845.
- Wopereis S, Lefeber DJ, Morava E, Wevers RA. (2006). Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: A review. *ClinChem*, 52(4), 574-600.
- Wuyts W, Van Hul W, Wauters J, Nemtsova M, Reyniers E, Van Hul EV, De Boule K, de Vries BB, Hendrickx J, Herrygers I, Bossuyt P, Balemans W, Franssen E, Vits L, Coucke P, Nowak NJ, Shows TB, Mallet L, van den Ouweland AM, McGaughan J, Halley DJ, Willems PJ. (1996). Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses. *Hum Mol Genet*, 5(10), 1547-57.
- Wuyts W, Van Hul W, De Boule K, Hendrickx J, Bakker E, Vanhoenacker F, Mollica F, Lüdecke HJ, Sayli BS, Pazzaglia UE, Mortier G, Hamel B, Conrad EU, Matsushita M, Raskind WH, Willems PJ. (1998). Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet.*, 62(2), 346-54.
- Wuyts W & Van Hul W. (2000). Molecular basis of multiple exostoses: mutations in the EXT1 and EXT2 genes. *Hum Mutat.*, 15(3), 220-7.
- Wuyts W, Radersma R, Storm K, Vits L. (2005). An optimized DHPLC protocol for molecular testing of the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple osteochondromas. *Clin Genet.*, 68(6), 542-7.
- Yan D & Lin X. (2009). Shaping morphogen gradients by proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1(3):a002493.
- Xu L, Xia J, Jiang H, Zhou J, Li H, Wang D, Pan Q, Long Z, Fan C, Deng HX. (1999). Mutation analysis of hereditary multiple exostoses in the Chinese. *Hum Genet.*, 105(1-2), 45-50.
- Yang L, Xie G, Fan Q, Xie J. (2010). Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene*, 29(4), 469-81.
- Zuntini M, Pedrini E, Parra A, Sgariglia F, Gentile FV, Pandolfi M, Alberghini M, Sangiorgi L. (2010). Genetic models of osteochondroma onset and neoplastic progression: evidence for mechanisms alternative to EXT genes inactivation. *Oncogene*, 29(26), 3827-34.

# ***PRODUCCIÓN CIENTÍFICA***

# A Novel Nonsense Mutation of the *EXT1* Gene in an Argentinian Patient with Multiple Hereditary Exostoses

## A Case Report

María Andrea Delgado, BS, Patricia Sarrión, BS, Nydia Azar, MS, Lorena Zecchini, MD, Hector Hugo Robledo, MD, Florencio Segura, MD, PhD, Susana Balcells, PhD, Daniel Grinberg, PhD, Raquel Dodelson de Kremer, MD, PhD, and Carla Gabriela Asteggiano, PhD

*Investigation performed at Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina*

**M**ultiple hereditary exostoses (MHE), also known as multiple osteochondromatosis, is an autosomal-dominant O-linked glycosylation disorder recently classified as *EXT1/EXT2*-CDG in the congenital disorder of glycosylation (CDG) nomenclature<sup>1</sup>. MHE is characterized by the presence of multiple cartilage-capped tumors, called “osteochondromas,” which usually develop in the juxta-epiphyseal regions of the long bones. The prevalence of MHE is estimated at 1:50,000 in the general population<sup>2,3</sup>. The Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database classified it as either 133700 or 133701, according to whether the mutations occurred in the *EXT1* or the *EXT2* gene. These genes are located at 8q24 and 11p11-11p12, respectively, and they encode the copolymerases responsible for heparan sulfate biosynthesis. *EXT1* and *EXT2* are tumor suppressor genes of the EXT gene family. The *EXT1* gene contains eleven exons with a coding region of 2238 base pairs (bp), and the *EXT2* gene contains sixteen exons with a coding region of 2154 bp<sup>4,7</sup>. These genes encode two glycosyltransferases involved in heparan sulfate biosynthesis, exostosin-1 (*EXT1*) (EC2.4.1.224) and exostosin-2 (*EXT2*) (EC2.4.1.225), whose impairment leads to the formation of exostoses<sup>5,8-10</sup>. Inactivating mutations (nonsense, frameshift, and splice site mutations) in *EXT1* and *EXT2* genes represent the majority of mutations that cause MHE. An overview of the reported variants is provided by the online Multiple Osteochondroma Mutation Database<sup>1</sup>.

The most important complication of MHE is the malignant transformation of osteochondroma to chondrosarcoma, which is estimated to occur in 0.5% to 5% of patients<sup>7</sup>. Chondrosarcomas arise de novo (primary) or as a result of a preexisting cartilage lesion (secondary). The biological aggressiveness of chondrosarcomas can be predicted by means

of a histological grading system (grade I to grade III), based on three parameters: cellularity, degree of nuclear atypia, and mitotic activity<sup>12,13</sup>.

In our case report, we investigated the clinical, radiographic, and genetic aspects of a patient with MHE with a severe phenotype and malignant transformation to chondrosarcoma. The patient was informed that data concerning her case would be submitted for publication, and she provided consent.

### Case Report

**O**ur patient, a thirty-two-year-old woman with MHE, was first identified with this disorder when she was twenty-six years old in the Orthopedic and Imaging Diagnosis Department of Children's Hospital of Cordoba, Argentina. She had developed a malignant transformation of a sessile osteochondroma in the left iliopubic region. She was included in the Argentinian Multiple Osteochondromatosis Program, which consisted of studies that had been approved by the Ethics Committee of the Children's Hospital of Cordoba (CIEIS) Act No. 95/2007. The phenotypic data were based on clinical examinations and radiographic measurements and were analyzed according to variables representing lesion quality: count, morphology, and location. The quality of lesions was classified as: (a) type-I lesions (the size of the lesions correspond to ≤25% of native bone size); (b) type-II lesions (the size of the lesions correspond to 26% to 49% of native bone size); (c) type-III lesions (the size of the lesions correspond to 50% to 74% of native bone size); and (d) type-IV lesions (the size of the lesions correspond to ≥75% of native bone size)<sup>14</sup>. The severity of the disease was assessed with five factors: age of onset, number of exostoses, absence or presence of vertebral location, stature, and functional rating (good

**Disclosure:** One or more of the authors received payments or services, either directly or indirectly (i.e., via his or her institution), from a third party in support of an aspect of this work. None of the authors, or their institution(s), have had any financial relationship, in the thirty-six months prior to submission of this work, with any entity in the biomedical arena that could be perceived to influence or have the potential to influence what is written in this work. Also, no author has had any other relationships, or has engaged in any other activities, that could be perceived to influence or have the potential to influence what is written in this work. The complete **Disclosures of Potential Conflicts of Interest** submitted by authors are always provided with the online version of the article.

TABLE I Clinical and Radiographic Features\*

Variable	Clinical and Radiographic Findings
Lesion quality	
No. of lesions	28 osteochondromas
Morphology	
Type of lesions	Type I ( $\leq 25\%$ of native bone size), 100%
	Simple lesions, 96.5% (n = 27)
	Complex lesions, 3.5% (n = 1)
Lesion characteristics	
	Sessile osteochondromas, 86% (n = 24)
	Pedunculated osteochondromas, 14% (n = 4)
Location	
	In pelvis, 17% (n = 5)
	In other bones, 83% (n = 23)
Age at onset (more or less than 3 years old)	>3 years old (12 years old)
Severity of the disease†	
No. of exostoses (more or less than 10 osteochondromas)	>10 osteochondromas (n = 28)
Vertebral location of the exostoses (absence or presence)	Presence (9 mm $\times$ 5-mm osteochondroma on the fifth cervical vertebra, lateral)
Stature (more or less than 10th percentile)	<3rd percentile
Functional rating (good or fair)	Fair
Degree of severity	Group S (severe) (IVS) with secondary chondrosarcoma in pelvis

\*Clinical classification of osteochondromas based on variables published by Boveé<sup>6</sup>. †Evaluation of severity described in Francanet et al.<sup>14</sup>.

or fair). The degree of severity was represented in two groups, M (moderate) or S (severe). Group S was classified into four clinical subgroups according to the increasing grade of severity (type IS, type IIS, type IIIS, and type IVS), especially with regard to the lower percentile<sup>14-16</sup>. In our patient, we defined the phenotype as severe (type IVS) based on the fair functional rating, the large number of exostoses (>25) and their vertebral locations, and very short stature (below the third percentile)<sup>15</sup>. In addition to the phenotype classification,

clinical and radiographic variables were defined for the patient (Table I).

In our patient, multiple osteochondromas were detected by radiographs. A tibiofibular osteochondroma was observed on the proximal side of the right knee (Fig. 1-A). A large chondrosarcoma was detected on the left iliopectoral bone (Fig. 1-B). In addition, there were left and right humeral osteochondromas, Madelung deformities in both radii (Fig. 1-C), and multiple tiny phalangeal osteochondromas. A pelvic magnetic

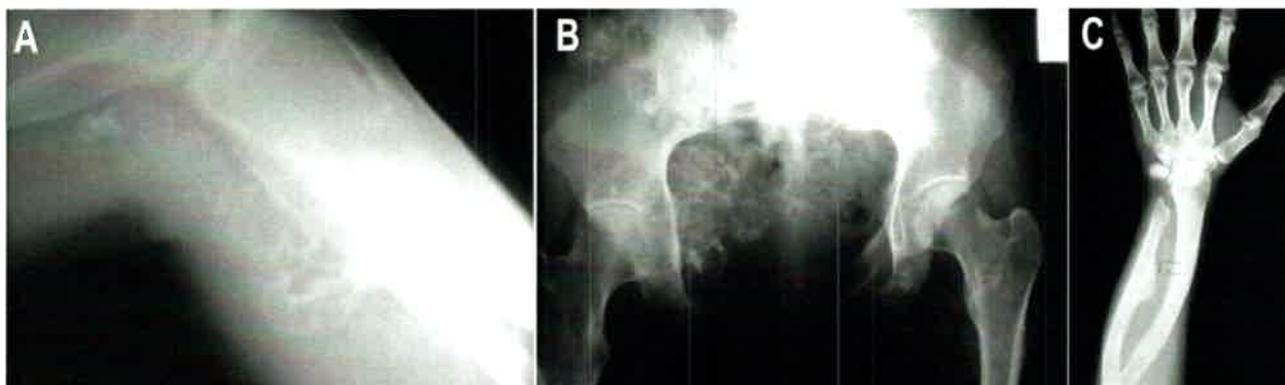


Fig. 1  
Radiographs demonstrating multiple osteochondromas at the tibia and fibula: next to the knee (Fig. 1-A), at the pelvis and proximal part of the femur (Fig. 1-B), and at the radius and ulna (Fig. 1-C).

TABLE II Polymerase Chain Reaction Primer Sequences Used for *EXT1* and *EXT2* Genes\*

Primers	Reverse	Forward
<i>EXT1</i> gene		
Exon 1.1	5'tgggaaactgggtgattctt 3'	3'gggatcaattggaaaacgaggattc 5'
Exon 1.2	5'ggcttcagtttagggcatcag 3'	3'tgttccacaagtggagactcttg 5'
Exon 1.3	5'ccagttgcacctcagtatgtc 3'	3'aactcacacctggaccaag 5'
Exon 2	5'tgcgtaaattcatgcacatgg 3'	3'ggtttaacattatcacctctcc 5'
Exon 3	5'tgcgtaaattcatgcacatgg 3'	3'ttcacttccaacaaaatctcc 5'
Exon 4	5'ctatatgctagaagccaaatgc 3'	3'gattcctgtactggatatattg 5'
Exon 5	5'tccattactctctgtcttg 3'	3'gtccatctaacacctgcat 5'
Exon 6	5'cctgtcaggacataagaagc 3'	3'gctcgttacaccttttca 5'
Exon 7	5'tctgccgttttctctgtc 3'	3'gctttgtgacctgtgtgat 5'
Exon 8	5'gtgaggatgggagaattgtc 3'	3'gttttaacagcccattcct 5'
Exon 9	5'gaattaatgttccacagtc 3'	3'ctgatgtgtcaaatgtgttt 5'
Exon 10	5'catcatcattatcattaccattc 3'	3'ccaaggatgtaaagctctcc 5'
Exon 11	5'ttgctgctgctcattggc 3'	3'cttagatgagcagaatgacaaa 5'
<i>EXT2</i> gene		
Exon 4.1	5'tgagtgacagagtgaaccc 3'	3'caaggtgtatatctatgctctg 5'
Exon 4.2	5'agccgacagtccatccc 3'	3'ctctgctctgagttggttt 5'
Exon 5	5'gttgggattccaggagtttc 3'	3'cctcctgaagatttagaagt 5'
Exon 6	5'ccgagatgctgtataaggc 3'	3'gctgtctaccaagtttctaag 5'
Exon 7	5'tcaagaactgtccaaataag 3'	3'gggtctctgttctgtgcaa 5'
Exon 8	5'agtattgcttggcgtcaacc 3'	3'gagagtttagtacctggctca 5'
Exon 9	5'aatggagctgtaagagaactc 3'	3'ggtttactctcactagat 5'
Exon 10	5'tggcttgaacagcaggag 3'	3'cctgataaggcagcacaatt 5'
Exon 11	5'caccaagcctccatgtttg 3'	3'catttctgagacagcatgcc 5'
Exon 12	5'accttggattgatgagagc 3'	3'gtgcgtaagagtgtgggta 5'
Exon 13	5'tctccagaatcccattatgac 3'	3'cacgctcatagtagaaaatag 5'
Exon 14	5'gtcactgacaaaagcattc 3'	3'ggactagataaacttaagctc 5'
Exon 15	5'ctgtgagttctccgttgg 3'	3'gaatgctactcactcaattgt 5'
Exon 16	5'acctgtcaaccttttaagaac 3'	3'gttgcactactggatcttg 5'

\*This table was created based on the methods of Wuyts et al.<sup>17</sup>

resonance imaging (MRI) study demonstrated an iliac mass in the left iliopubic bone with a heterogeneous signal, with limb and pelvic compromise (Figs. 2-A and 2-B). The tissue had

been resected with indistinct margins three times, but soon recurred. Clinically, the lesion behaved as a chondrosarcoma, and, in all three specimens obtained at the time of surgery, the



Fig. 2

**Figs. 2-A and 2-B** Our patient at age thirty-two. **Fig. 2-A** shows a chondrosarcoma in the pelvis and the proximal part of the femur. **Fig. 2-B** The coronal image of the pelvic MRI shows a large iliac mass on the left with a heterogeneous appearance, as well as shell and nodular calcifications growing into the inner pelvis, which produced lower-extremity compromise.

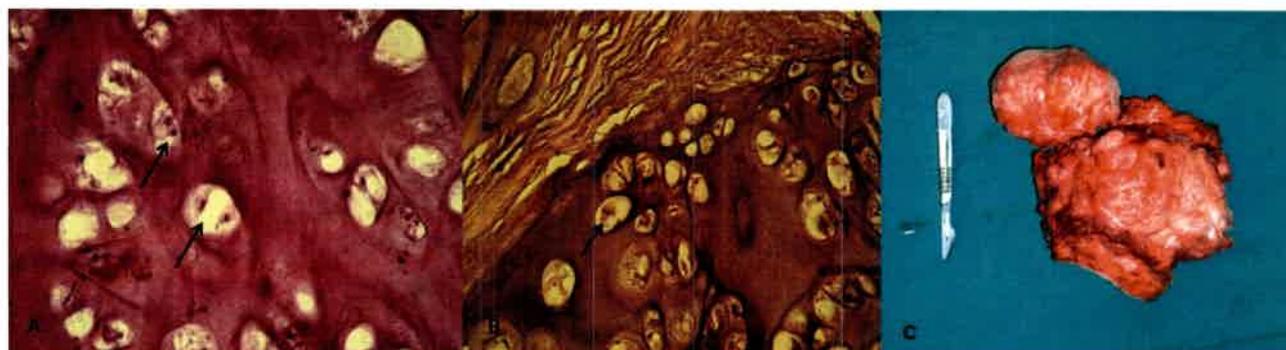


Fig. 3

**Figs. 3-A and 3-B** Histologic findings (**Fig. 3-A**, hematoxylin and eosin stain, 100× magnification; **Fig. 3-B**, hematoxylin and eosin stain, 40× magnification) of the neoplasm excised from the chondrosarcoma showed a mesenchymal neoplasm with cartilaginous matrix production. The arrows point to nuclear enlargement and occasional binucleation of the atypical chondrocytes. **Fig. 3-C** A photograph of the resected tissue from the first incomplete excision.

histological findings demonstrated a low-grade neoplasia (grade-I chondrosarcoma).

Gross and microscopic evaluation of the pelvic tumor tissue showed a mesenchymal neoplasm with cartilaginous matrix production (Figs. 3-A and 3-B). Infiltration of cartilaginous islands in underlying bone tissue, with a profile of an expansive invasion, was also observed. Tissue that was excised during the first operation is shown in Figure 3-C. The family history revealed that the patient's mother (fifty-three years old) and deceased grandfather both had a similar clinical presentation of MHE but without malignant transformation to chondrosarcoma (Fig. 4-A). The mother had the same clinical and imaging studies as the daughter, and the previously described variables also were analyzed.

We observed the same fair functional rating in the mother as in our patient, but, based on the absence of vertebral locations and her taller stature (below the 10th percentile), the degree of severity was classified as group IIS.

Genetic studies were performed for both our patient and her mother. The DNA taken from the patient's blood and the tumor tissue was studied through direct mutational analysis with use of primer pairs to amplify the coding regions and the flanking intronic sequences of the *EXT1* and *EXT2* genes, modified from the methods of Wuyts et al.<sup>17</sup> (Table II). Polymerase chain reaction products were sequenced on an ABI Prism DNA Analyzer 3700 or 3730 (Applied Biosystems), with use of BigDye Terminator chemistry (Applied Biosystems)<sup>17</sup>. Loss of heterozygosity was assessed in the tumor DNA<sup>18</sup>.

A novel heterozygous mutation in the genomic DNA of the patient was identified: a substitution in exon 1 of the *EXT1* gene (c.848T>A) changed a leucine codon into a stop codon (p.L283X) in the *EXT1* protein (Fig. 4-B). The patient was also heterozygous for the single nucleotide polymorphism rs11546829 in exon 3 of the *EXT1* gene (Table III). Loss of heterozygosity was not observed in the analysis of DNA in the tumor tissue. The same heterozygous nonsense mutation in exon 1 (c.848T>A; p.L283X) was detected in the patient's mother.

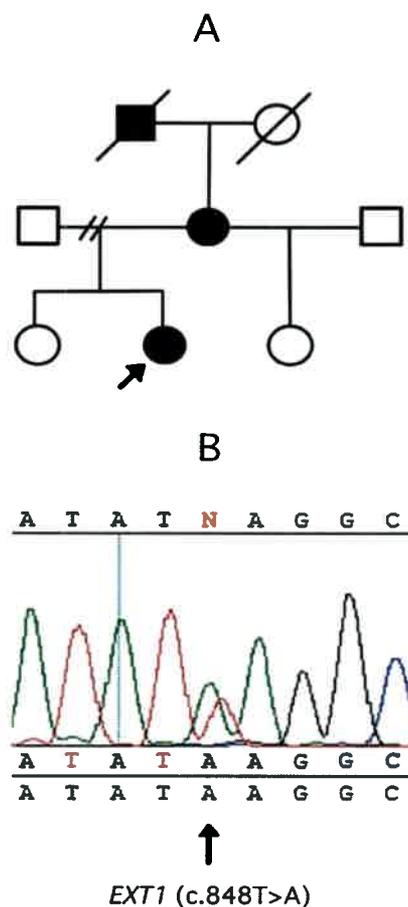


Fig. 4

**Figs. 4-A and 4-B** Pedigree of the family studied and mutation detection in the *EXT1* gene. **Fig. 4-A** The patient is marked with an arrow, and other affected members are indicated by black squares or circles. **Fig. 4-B** Exon 1 partial sequence of the *EXT1* gene. The arrow indicates the precise mutation in the patient (c.848T>A).

TABLE III *EXT1* Gene Changes Detected in Our Patient by Polymerase Chain Reaction and Direct Sequencing\*

Gene	Exon/Intron	DNA Change	Protein Change	Ref SNP_ID†	Patient's Genotype	MAF‡
<i>EXT1</i>	Exon 1	c.848T>A	p.L283X	—	T/A	—
<i>EXT1</i>	Exon 3	c.1035C>T	p.C355C	rs11546829	C/T	0.233
<i>EXT1</i>	Exon 9	c.1761G>A	p.E587E	rs7837891	A/A	0.367

\*No changes were found in *EXT2*. †Reference single nucleotide polymorphism. ‡Minor allele frequencies in a CEU population (dbSNP).

## Discussion

According to previous reports, the identification of novel and private mutations in a single family or patient support the strong allelic heterogeneity of *EXT1* or *EXT2* genes in patients with MHE<sup>19</sup>. To our knowledge, our case represents the first clinical and genetic report in the hereditary multiple osteochondromatosis program in Argentina and other Latin American countries, in collaboration with an interdisciplinary Spanish research group. The patient and her mother presented a heterozygous transversion in exon 1 (c.848T>A), resulting in a nonsense mutation (p.L283X) with loss of function in the amino-terminal region of the protein, which led to a prematurely truncated *EXT1*. The mutated protein only conserves 30.4% of the amino acids compared with the wild-type protein. Most patients with MHE present a wide spectrum of mutations in the *EXT1* gene, most of which are null<sup>11,15,17,19</sup>.

We observed differences in the grade of severity between the patient and her mother, similar to the intrafamilial variability reported previously in other families with MHE<sup>2</sup>. This finding supports the variation in the expressivity of MHE that is in favor of genetic anticipation in this disease<sup>15</sup>.

It has been shown that hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcomas are associated with a second mutational hit in the *EXT1* gene<sup>20,21</sup>. In our patient, we did not observe loss of heterozygosity as indicative of a somatic deletion in the DNA of the tumor. This situation rules out a complete deletion of the second *EXT1* allele. A screening with a combined multiplex ligation-dependent probe amplification protocol could be performed to assess the presence of genetic rearrangements affecting other parts of the *EXT1* gene<sup>22</sup>.

Although a basic molecular defect is known in most patients with MHE (a heterozygous mutation in either *EXT1* or *EXT2*), the pathogenic mechanism is still unclear. Despite the

fact that heparan sulfate proteoglycans have many roles in cell physiology and in different tissues, the loss of their specific function in chondrocytes and their deregulation in bone growth plate seem to be the principal cause of this pathology. ■

María Andrea Delgado, BS  
Nydia Azar, MS  
Raquel Dodelson de Kremer, MD, PhD  
Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO),  
Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Ferroviarios 1250,  
CP: X5014AKN Córdoba, Argentina.

Carla Gabriela Asteggiano, PhD  
Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO),  
Universidad Nacional de Córdoba/Cátedra de Química Biológica,  
Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba,  
Ferroviarios 1250, CP: X5014AKN Córdoba, Argentina.  
E-mail address: asteggianocarla@hotmail.com

Patricia Sarrión, BS  
Susana Balcells, PhD  
Daniel Grinberg, PhD  
Departament de Genètica, Facultat de Biologia,  
Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645,  
CP: 08028 Barcelona, Spain

Lorena Zecchini, MD  
Hector Hugo Robledo, MD  
Florencio Segura, MD, PhD  
Servicio de Traumatología (L.Z. and F.S.),  
Servicio de Bioimágenes (H.H.R.),  
Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Ferroviarios 1250,  
CP: X5014AKN Córdoba, Argentina

## References

- Jaeken J, Hennet T, Matthijs G, Freeze HH. CDG nomenclature: time for a change! *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:825-6.
- Schmale GA, Conrad EU 3rd, Raskind WH. The natural history of hereditary multiple exostoses. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76:986-92.
- Sandell LJ. Multiple hereditary exostosis, EXT genes, and skeletal development. *J Bone Joint Surg Am*. 2009 Jul;91 Suppl 4:58-62.
- Ahn J, Lüdecke HJ, Lindow S, Horton WA, Lee B, Wagner MJ, Horsthemke B, Wells DE. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet*. 1995;11:137-43.
- Stickens D, Clines G, Burbee D, Ramos P, Thomas S, Hogue D, Hecht JT, Lovett M, Evans GA. The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nat Genet*. 1996;14:25-32.
- Lüdecke HJ, Ahn J, Lin X, Hill A, Wagner MJ, Schomburg L, Horsthemke B, Wells DE, Lüdecke HJ, Ahn J, Lin X, Hill A, Wagner MJ, Schomburg L, Horsthemke B, Wells DE. *Genomics*. 1997;40:351-4.
- Bovéé JV. Multiple osteochondromas. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:3.
- McCormick C, Leduc Y, Martindale D, Mattison K, Esford LE, Dyer AP, Tufaro F. The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nat Genet*. 1998;19:158-61.
- Lind T, Tufaro F, McCormick C, Lindahl U, Lidholt K. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem*. 1998;273:26265-8.
- Simmons AD, Musy MM, Lopes CS, Hwang LY, Yang YP, Lovett M. A direct interaction between EXT proteins and glycosyltransferases is

defective in hereditary multiple exostoses. *Hum Mol Genet.* 1999;8:2155-64.

11. Jennes I, Pedrini E, Zuntini M, Mordenti M, Balkassmi S, Asteggiano CG, Casey B, Bakker B, Sangiorgi L, Wuyts W. Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MOdb). *Hum Mutat.* 2009;30:1620-7.

12. Hasegawa T, Seki K, Yang P, Hirose T, Hizawa K, Wada T, Wakabayashi J. Differentiation and proliferative activity in benign and malignant cartilage tumors of bone. *Hum Pathol.* 1995;26:838-45.

13. Kivioja A, Ervasti H, Kinnunen J, Kaitila I, Wolf M, Böbling T. Chondrosarcoma in a family with multiple hereditary exostoses. *J Bone Joint Surg Br.* 2000;82:261-6.

14. Alvarez C, Tredwell S, De Vera M, Hayden M. The genotype-phenotype correlation of hereditary multiple exostoses. *Clin Genet.* 2006;70:122-30.

15. Francannet C, Cohen-Tanugi A, Le Merrer M, Munnich A, Bonaventure J, Legeat-Mallet L. Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses. *J Med Genet.* 2001;38:430-4.

16. Alvarez CM, De Vera MA, Heslip TR, Casey B. Evaluation of the anatomic burden of patients with hereditary multiple exostoses. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;462:73-9.

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

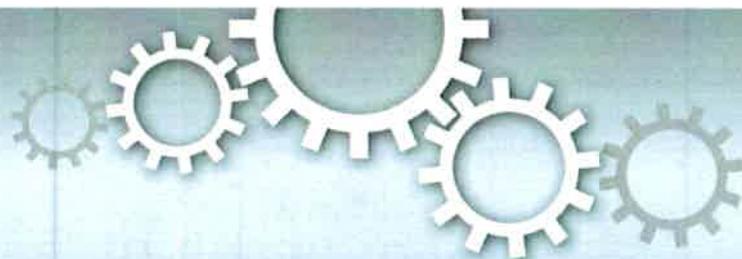
18. Raskind WH, Conrad EU, Chansky H, Matsushita M. Loss of heterozygosity in chondrosarcomas for markers linked to hereditary multiple exostoses loci on chromosomes 8 and 11. *Am J Hum Genet.* 1995;56:1132-9.

19. Pedrini E, De Luca A, Valente EM, Maini V, Capponcelli S, Mordenti M, Mingarelli R, Sangiorgi L, Dallapiccola B. Novel *EXT1* and *EXT2* mutations identified by DHPLC in Italian patients with multiple osteochondromas. *Hum Mutat.* 2005;26:280.

20. Bovée JV. EXTra hit for mouse osteochondroma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:1813-4.

21. Hecht JT, Hogue D, Wang Y, Blanton SH, Wagner M, Strong LC, Raskind W, Hansen MF, Wells D. Hereditary multiple exostoses (EXT): mutational studies of familial *EXT1* cases and EXT-associated malignancies. *Am J Hum Genet.* 1997;60:80-6.

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



## Mutations in the *EXT1* and *EXT2* genes in Spanish patients with multiple osteochondromas

P. Sarrión<sup>1</sup>, A. Sangorrin<sup>2</sup>, R. Urreiziti<sup>1</sup>, A. Delgado<sup>3</sup>, R. Artuch<sup>2</sup>, L. Martorell<sup>2</sup>, J. Armstrong<sup>2</sup>, J. Anton<sup>2</sup>, F. Torner<sup>2</sup>, M. A. Vilaseca<sup>2</sup>, J. Nevado<sup>4</sup>, P. Lapunzina<sup>4</sup>, C. G. Asteggiano<sup>3,5,6</sup>, S. Balcells<sup>1\*</sup> & D. Grinberg<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, CIBERER, IBUB, Spain, <sup>2</sup>Hospital Sant Joan de Déu, CIBERER, Barcelona, Spain, <sup>3</sup>CEMECO, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, <sup>4</sup>INGEMM-IdiPaz, Hospital Universitario La Paz, CIBERER, Madrid, Spain, <sup>5</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Córdoba, Argentina, <sup>6</sup>Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina.

SUBJECT AREAS:  
GENETIC CAUSE OF DISEASE  
BONE CANCER  
METABOLIC DISORDERS  
BONE DEVELOPMENT

Received  
26 October 2012

Accepted  
7 February 2013

Published  
26 February 2013

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.G. (dgrinberg@ub.edu)

\* These authors contributed equally to this work.

Multiple osteochondromas is an autosomal dominant skeletal disorder characterized by the formation of multiple cartilage-capped tumours. Two causal genes have been identified, *EXT1* and *EXT2*, which account for 65% and 30% of cases, respectively. We have undertaken a mutation analysis of the *EXT1* and *EXT2* genes in 39 unrelated Spanish patients, most of them with moderate phenotype, and looked for genotype-phenotype correlations. We found the mutant allele in 37 patients, 29 in *EXT1* and 8 in *EXT2*. Five of the *EXT1* mutations were deletions identified by MLPA. Two cases of mosaicism were documented. We detected a lower number of exostoses in patients with missense mutation versus other kinds of mutations. In conclusion, we found a mutation in *EXT1* or in *EXT2* in 95% of the Spanish patients. Eighteen of the mutations were novel.

**M**ultiple osteochondromas (MO, MIM#133700, #133701), also known as multiple hereditary exostoses, is an autosomal dominant skeletal disorder characterized by the formation of multiple cartilage-capped tumours (exostoses or osteochondromas). The prevalence of MO is estimated at 1/50,000 in the Western population<sup>1</sup>. Osteochondromas are the result of excessive chondrocyte proliferation and bone growth at the juxtaepiphyseal regions of long bones and are the most common benign bone tumour. MO is characterized by an important inter- and intra-familial phenotypic variability, including variations in the number and size of osteochondromas and in the number and location of bones involved. Secondary complications are heterogeneous too, and may consist of deformities, functional limitations, compression of nerves and blood vessels, pain caused by pressure on neighbouring tissues and short stature<sup>2</sup>. The most serious secondary complication is the malignant transformation toward a secondary peripheral chondrosarcoma, occurring in 0.5–5% of patients<sup>3</sup>.

MO is a genetically heterogeneous disease. In almost 90% of MO patients, germline mutations in *EXT1* (MIM #608177)<sup>4</sup> or *EXT2* (MIM #608210)<sup>5,6</sup> are found. *EXT1* maps to chromosome 8q24.11–q24.13, comprises 11 exons and spans approximately 350 kb<sup>7</sup>, while *EXT2*, located at 11p11–p11.2, consists of 16 exons and spans almost 108 kb<sup>8</sup>. Both genes act as tumour suppressors. Involvement of other genes has been suggested, since there are families with no mutation identified in either *EXT1* or *EXT2*.

The *EXT* genes encode ubiquitous glycosyltransferases, catalyzing heparan sulfate (HS) polymerization at HS proteoglycans (HSPGs). These HSPGs play a major role in the diffusion of signalling molecules such as Indian Hedgehog (Ihh), which is an important regulator of chondrocyte proliferation and differentiation in the growth plate<sup>9</sup>.

Approximately 10% of patients have a *de novo* mutation<sup>10</sup>. Loss of the wild-type allele in hereditary cases indicates that inactivation of both *EXT* alleles is required for osteochondroma formation<sup>11</sup>, confirming their tumour suppressor action that results in a loss of chondrocyte polarization<sup>12</sup>. However, the inactivation of both alleles probably occurs only in some of the cells in the cartilaginous cap of osteochondromas<sup>12,13</sup>.

Several studies have reported on MO causing mutations in different populations. These are being gathered in the Multiple Osteochondromas Mutation Database (MOdb) (<http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>), currently listing over 400 and 200 different mutations in *EXT1* and *EXT2*, respectively. Most of the mutations (80%) are nonsense, frame-shift and splice-site mutations, resulting in a premature termination of translation, or involve partial or total deletion of the gene. Although it has been suggested that mutations in *EXT1* are associated with a



more severe phenotype than mutations in *EXT2*<sup>14–16</sup>, many aspects of the phenotypic variability observed in patients have yet to be understood at the genetic level. As suggested by the Human Variome Project initiative, characterization of causative mutations in familial and sporadic cases in diverse populations is needed for full understanding of Mendelian diseases<sup>17</sup>.

Here we present the mutational analysis of 39 unrelated Spanish MO patients and the clinical features of most of them. This is the first report of MO mutations in the Spanish population.

## Results

**Clinical features.** The main clinical features of the patients are detailed in Table 1. Most of the patients (77%) had deformities (classes II and III). More than half the cases (51%) had more than 20 exostoses. Mean age of onset was 2 years and clinical evaluation was performed, on average, 12 years later. Only one of the 39 cases developed a malignant transformation.

***EXT1* and *EXT2* point mutations.** On sequencing all exons and flanking regions of the *EXT1* and *EXT2* genes in the samples of 39 unrelated patients, 31 pathogenic point mutations were identified (Table 2). Twenty-four different mutations were found in the *EXT1* gene, while 7 were found in *EXT2*. One of them (*EXT2*, c.544C > T) was found in two unrelated patients. Eighteen out of the 31 mutations were novel, two of them missense in *EXT1*: p.Asp231Val and p.Pro337Arg. Bioinformatic predictions suggested a pathogenic role for both of them [PolyPhen, probably\_damaging (1); SIFT, deleterious (0)]. The mutation screening also detected two changes that were interpreted as non-pathogenic (*EXT1*, c.962+8\_962+11delTCTG and *EXT2*, c.1178G > A), indicated in italics in Table 2. These two changes were found in patients BCN33 and BCN29, respectively, together with additional mutations, as indicated in Figure 1 and Table 2. In the case of BCN33, the patient inherited the *EXT1*, c.962+8\_962+11delTCTG change

from his unaffected mother, while the other mutation, *EXT2*, c.544C > T (p.Arg182\*), was putatively inherited from his affected father (from whom a sample was not available). Patient BCN29 inherited the *EXT2*, c.1178G > A (p.Arg393Gln) change from her unaffected father, while she presented with a *de novo*, previously described mutation in the *EXT1* gene: c.1019G > C (p.Arg340Pro). After sequencing and thorough manual checking of chromatograms, seven patients remained undiagnosed at the molecular level.

***EXT1* deletions.** Exon dosage for *EXT1* and *EXT2* was assessed by MLPA analysis of the seven samples without identified point mutations. Five unrelated patients (BCN06, BCN07, BCN19, BCN20/25 and BCN22) were found to bear different *EXT1* deletions (Figure 2 and Table 2). No large deletion was found in the *EXT2* gene. The proband from family 20/25 was hemizygous for all *EXT1* exons (i.e., he presented with half a dose), while probands BCN06 and BCN07 (the latter not shown in Figure 2) were hemizygous for exons 2 to 11, and patient BCN19 was hemizygous only for exon 8. In contrast, patient BCN22 showed a partial loss of dose for exons 2 to 11, consistent with a mosaic constitution (see Figure 2). Relatives of patient BCN06, including the affected father, were available for MLPA examination. As seen in Figure 2, the father had a partial loss of dose of exons 2 to 11, compared with the unaffected relatives (proband's mother and brother), consistent with a case of mosaicism for the deletion present in his son. For two cases (BCN21 and BCN28) no mutation was found after sequencing and MLPA analyses.

**Phenotype-genotype correlations.** We examined the *EXT1* and *EXT2* mutations in relation to the various phenotypic aspects shown in Table 1. Gene distribution within the three clinical classes showed a higher proportion of *EXT2* mutations in class III than in classes I and II (Figure 3A). No significant differences were found when comparing patients with *EXT1* and *EXT2* mutations for

**Table 1 | Clinical and genetic data of the 39 patients with multiple osteochondromas**

	All patients n = 39	With <i>EXT1</i> mutations n = 29 (74.4%)	With <i>EXT2</i> mutations n = 8 (20.5%)	No mutation n = 2 (5.1%)
<b>Clinical class</b>				
I	7 (18.9%)	6 (21.4%)	1 (14.3%)	0
II	17 (45.9%)	14 (50.0%)	2 (28.6%)	1 (50.0%)
III	13 (35.1%)	8 (28.6%)	4 (57.1%)	1 (50.0%)
NA	2	1	1	0
<b>Number of exostoses</b>				
≤5	3 (8.1%)	3 (10.7%)	0	0
6–20	14 (37.8%)	9 (32.1%)	4 (57.1%)	1 (50.0%)
>20	20 (54.1%)	16 (57.1%)	3 (42.9%)	1 (50.0%)
NA	2	1	1	0
<b>Malignant transformation</b>	1	1	0	0
<b>Gender</b>				
Male	24 (61.5%)	17 (58.6%)	5 (62.5%)	2 (100%)
Female	15 (38.5%)	12 (41.4%)	3 (37.5%)	0
<b>Disease onset</b>				
Range	0.5–5	0.5–5	0.5–3	2
Mean (SD)	2 (1.53)	2 (1.60)	1 (1.21)	2 (0)
<b>Lumbar densitometry</b>				
Impaired	6 (33.3%)	4 (28.6%)	2 (50%)	-
Normal	12 (66.6%)	10 (71.4%)	2 (50%)	-
NA	21	15	4	2
<b>Type of mutation</b>				
Missense	6 (15.4%)	6 (20.7%)	0	-
Other	31 (79.5%)	23 (79.3%)	8 (100%)	-
Not found	2 (5.1%)	0	0	2

NA: not available.

Table 2 | Mutations in the *EXT1* and *EXT2* genes

Gene	Exon or intron	cDNA change	Protein change	Reference	Family
<i>EXT1</i>	Exon 1	c.208C > T	p.Gln70*	Present study	BCN01
	Exon 1	c.228_229delCA	p.Ser76Serfs*111	Present study	BCN36
	Exon 1	c.294C > A	p.Cys98*	Present study	MAD03
	Exon 1	c.369_370delA	p.Glu125Argfs*11	Present study	BCN40
	Exon 1	c.551G > A	p.Trp184*	Present study	MAD04
	Exon 1	c.552G > A	p.Trp184*	Present study	BCN31
	Exon 1	c.692A > T	p.Asp231Val	Present study	BCN11
	Exon 1	c.793delG	p.Val265Tyrfs*8	Jennes et al. <sup>21</sup>	BCN09 <sup>†</sup>
	Intron 1	c.962+8_962+11delTCTG	Unknown	Signori et al. <sup>23</sup>	BCN33
	Exon 2	c.967_972del	p.Asp323_Tyr324del	Present study	BCN39
	Exon 2	c.1010C > G	p.Pro337Arg	Present study	BCN35
	Exon 2	c.1016G > A	p.Gly339Asp	Philippe et al. <sup>28</sup>	BCN15
	Exon 2	c.1019G > C	p.Arg340Pro	LOVD <sup>‡</sup>	BCN29
	Exon 2	c.1019G > A	p.Arg340His	Raskind et al. <sup>29</sup>	MAD01
	Exon 2	c.1021A > G	p.Arg341Gly	LOVD <sup>‡</sup>	BCN26
	Intron 2	c.1057-3C > G	Unknown	LOVD <sup>‡</sup>	MAD02
	Intron 2	c.1057-2A > C	Unknown	Present study	BCN32
	Intron 3	c.1164+1G > A	Unknown	Present study	BCN38
	Exon 4	c.1261A > T	p.Lys421*	Present study	BCN14
	Exon 6	c.1468delC	p.Leu490Argfs*9	Signori et al. <sup>23</sup>	BCN42
	Exon 6	c.1469delT	p.Leu490Argfs*9	Ahn et al. <sup>4</sup>	BCN41
	Exon 8	Deletion exon 8	p.Val545_Glu574del	Jennes et al. <sup>21</sup>	BCN19
	Intron 9	c.1883+2T > G	Unknown	Seki et al. <sup>30</sup>	BCN05
	Exon 10	c.1896C > G	p.Tyr632*	Heinritz et al. <sup>31</sup>	BCN27
	Exon 10	c.1896C > A	p.Tyr632*	Lonie et al. <sup>32</sup>	BCN37
	Exon 10	c.2051_2053del3insA	p.Gly684Glufs*10	Present study	BCN03
	Exon 1-11	Exon 1-11 deletion	Unknown	Jennes et al. <sup>21</sup>	BCN20/25
Exon 2-11	Exon 2-11 deletion	Unknown	Jennes et al. <sup>21</sup>	BCN06; BCN07	
<i>EXT2</i>	Exon 2-11	Mosaic deletion	Unknown	Szuhai et al. <sup>24</sup>	BCN22 <sup>‡</sup>
	Exon 2	c.415_416delGA	p.Asp139Glnfs*2	Present study	BCN17
	Exon 2	c.424_425insT	p.Tyr142Leufs*4	Present study	BCN34
	Exon 3	c.540G > A	p.Trp180*	Present study	BCN04
	Exon 3	c.544C > T	p.Arg182*	Dobson-Stone et al. <sup>25</sup>	BCN18; BCN33
	Exon 5	c.783_789del7	p.His262Serfs*6	Present study	BCN10
	Exon 6	c.1073G > A	p.Trp358*	LOVD <sup>‡</sup>	BCN30
	Exon 8	c.1178G > A	p.Arg393Gln	Present study	BCN29
	Exon 8	c.1278T > A	p.Tyr426*	Present study	BCN13

In italics: non-pathogenic variants (see text and Figure 1 for details).

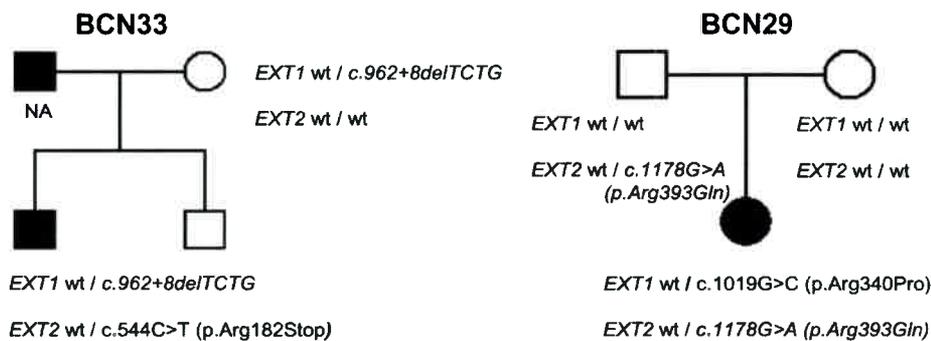
<sup>†</sup>Patient with malignant transformation.

<sup>‡</sup><http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>.

\*A similar mosaic deletion was found in the father of patient BCN06.

age of disease onset or number of osteochondromas. In *EXT1* patients, we compared the group of 6 individuals bearing missense mutations with 18 patients carrying other type of mutations (nonsense and small or large insertions and deletions) in relation to the number of exostoses. As shown in Figure 3B, a significant difference was found (mean number of exostoses for missense =

14.33; SD = 8.24; mean for other = 26.50; SD = 12.66;  $p = 0.04$ ). However, no significant difference in the age of onset of the disease was found between these two groups (not shown). Lumbar densitometry was performed in 18 patients: results showed impairment in 6 cases, which harboured non-missense mutations, 4 in *EXT1* gene and 2 in *EXT2* gene.

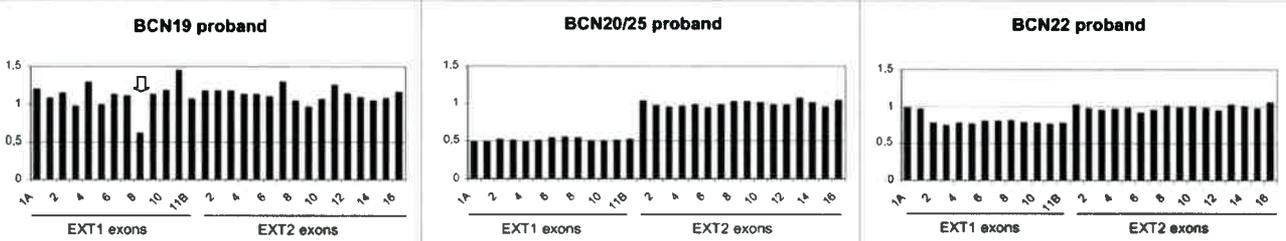
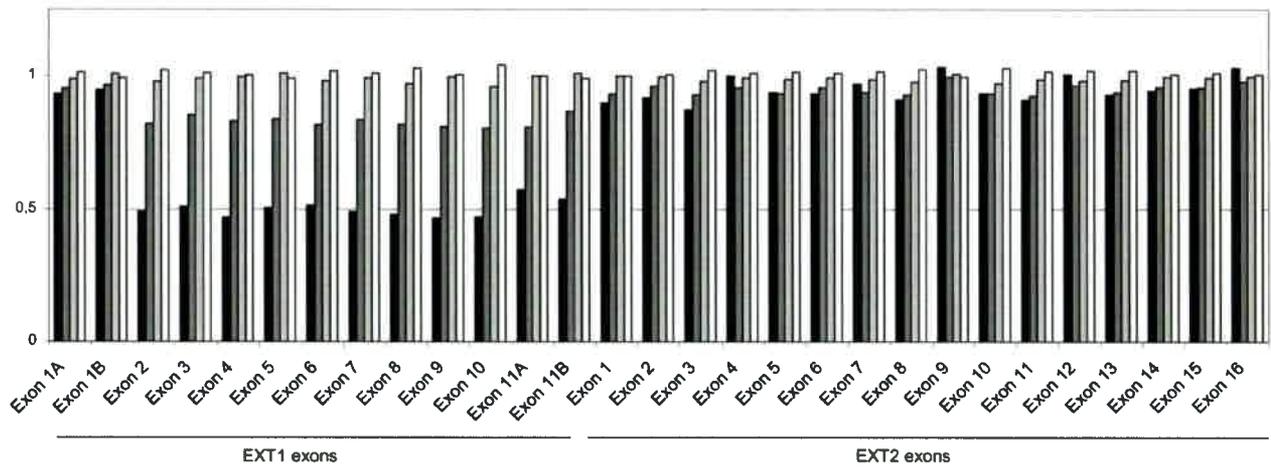


**Figure 1** | Segregation analysis in the BCN33 and BCN29 families, in which the probands were found to bear two mutations each, one in *EXT1* and one in *EXT2*. Italics indicate mutations considered non-pathogenic. NA: DNA not available.



### BCN06 family

■ Proband ■ Affected father □ Mother □ Brother



**Figure 2 |** MLPA results for some of the patients bearing deletions of different size in the *EXT1* gene. In the Y axis, 1 and below 0.6 correspond to full dose (two copies) and half dose (one copy) of the corresponding exons, respectively. For the BCN06 family, results for different members of the family are shown. Arrow in BCN19 proband indicates the deletion of exon 8.

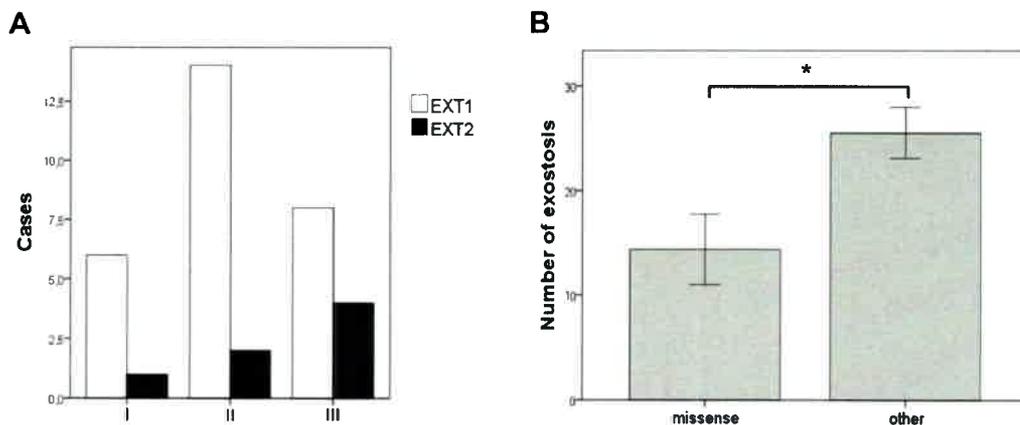
**Patients without identified mutations in *EXT1* or *EXT2*.** Details of the two unrelated patients (BCN21 and BCN28) with no identified *EXT1* or *EXT2* mutations are included in Table 1. Patient BCN21 was a son of an unaffected couple, while BCN28 inherited the disease from his father. Both presented with a number of exostoses and an onset age that are within the range of the rest of the patients.

### Discussion

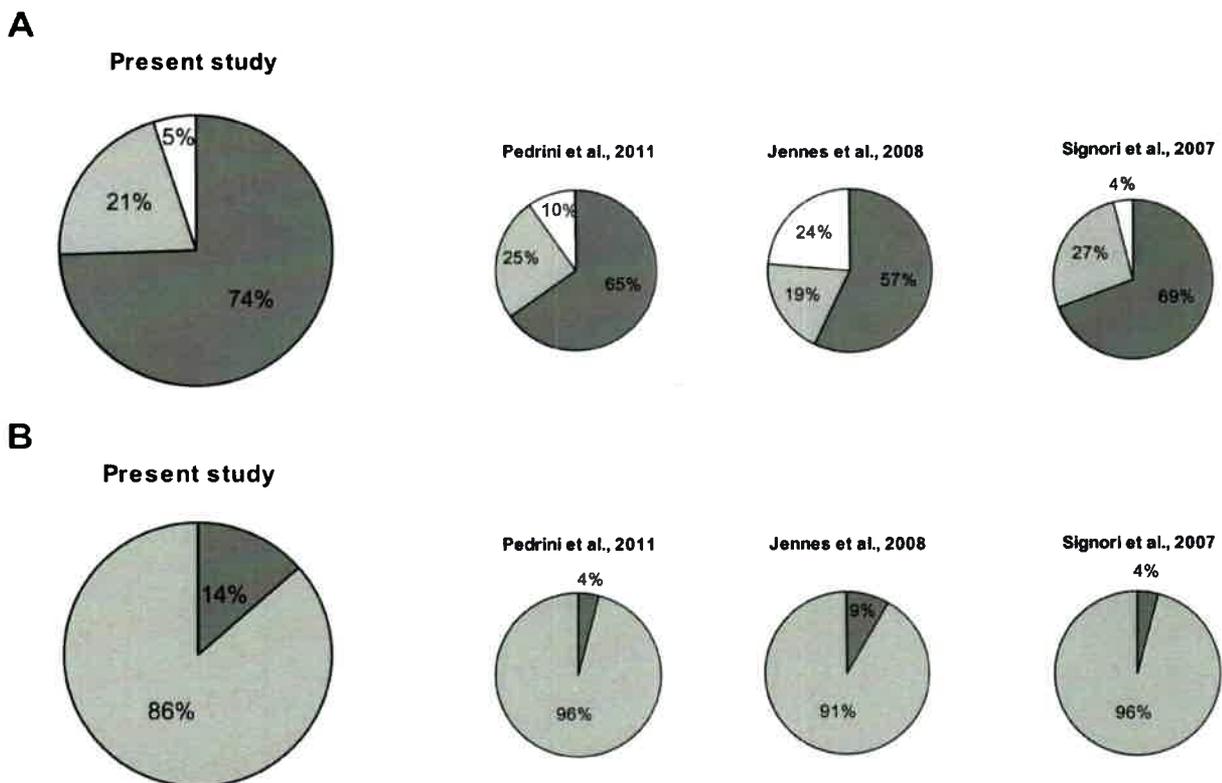
Thirty-nine Spanish unrelated patients were analyzed and the mutant allele was identified in 37 of them. Twenty-nine patients

(74%) had mutations in *EXT1*, while 8 (21%) had mutations in *EXT2* (Figure 4A). Only two patients remained undiagnosed at the molecular level. Genotype-phenotype correlations were analysed. Patients bearing *EXT1* missense mutations correlated with a lower number of exostoses.

The greater number of *EXT1* mutations is in agreement with most other studies of different populations (Figure 4A)<sup>10,14,18,21–23</sup>. The proportion of missense mutation (15.4%) agrees with the large study by Pedrini et al.<sup>18</sup>. All the missense mutations were in *EXT1* and 5 out of the 6 clustered in residues 337–341, while the novel missense



**Figure 3 |** Genotype-phenotype correlations. (A) Distribution of cases with mutations in *EXT1* or *EXT2* among the three clinical classes. (B) Average number of exostoses among patients bearing missense mutations in *EXT1* (n = 6) or other type of mutations (nonsense and small or large insertions and deletions) in the same gene (n = 18).



**Figure 4 | Comparison of mutation frequencies with previous studies.** (A) Proportion of *EXT1* mutation cases (dark grey), *EXT2* mutation cases (light grey) and cases with no mutation identified (white). (B) Among cases with identified mutations, proportion of large rearrangements (at least one exon) are shown in dark grey, while point mutations and small insertions and deletions are shown in light grey.

mutation (p.Asp231Val), lay outside this region. Five probands (14% of the cases) were found to carry partial or whole *EXT1* deletions. This proportion is higher than that found by Jennes et al.<sup>21</sup> and Signori et al.<sup>23</sup> (Figure 4B). All these deletions had been previously described<sup>21</sup>. However, whether the breakpoints in all cases are the same or not remains to be studied. Only one publication has addressed this issue and found that two cases with deletion of exons 2 to 11 of *EXT1* (and two cases with an exon 8 deletion in *EXT2*) bore different breakpoints<sup>21</sup>.

We found two cases of mosaicism for the exon 2–11 deletion, which deserve further discussion. In one case, the patient (BCN06) bore the deletion, while the father, from whom he had inherited the disease, was discovered to be a mosaic thanks to the previous finding of the son's mutation. The other case (BCN22) showed results that were consistent with a deletion, although the MLPA values for exons 2 to 11 were above the threshold for hemizyosity (see Figure 2). These cases are similar to those described by Szuhai et al.<sup>24</sup>. Both mosaic cases (BCN06f and BCN22) had an early disease onset (2 years) and neither was affected less than the average (BCN22 belongs to class IIB). This suggests that mosaic mutations play a role in the pathology: it seems that the deletion of one allele (or of a large part of it) in a relatively small number of cells is enough to trigger the phenotype. However, mosaicism was observed in blood cells, while the actual status in bone remains to be studied.

Two patients bore two changes each, one in *EXT1* and one in *EXT2*. In patient BCN33, the *EXT2* nonsense mutation is undoubtedly pathogenic, has been previously described<sup>25</sup> and was also found in another patient in our series (BCN18). On the other hand, the pathogenic effect of the donor splice site deletion in intron 1 of *EXT1* is dubious. It was described as a pathogenic mutation by Signori et al.<sup>23</sup>, in an Italian MO patient, and was absent in 100 Spanish control chromosomes. However, the splice score was not affected

by the change (data not shown). A novel putative donor site generated by the 4-bp deletion has a very low score, making its use unlikely. Moreover, the patient inherited the disease from his father (Figure 1B) and there are several affected relatives on the paternal side. However, the patient inherited the intron 1 4-bp deletion from his healthy mother (and there are no affected relatives on the mother's side). The best explanation with the available data is that the 4-bp deletion in intron 1 is a rare non-pathogenic variant. Patient BCN29 inherited the *EXT2* c.1178G > A (p.Arg393Gln) from her unaffected father (Figure 1B). Additionally, she presented with a *de novo* *EXT1* mutation: c.1019G > C (p.Arg340Pro). This mutation has been previously described by several authors and reviewed by Jennes et al.<sup>10</sup>. That the father had the *EXT2* p.Arg393Gln change and is unaffected and that the other mutation was shown to be pathogenic strongly suggest that the former is a non-pathogenic variant. Protein sequence alignments show that *Drosophila melanogaster* bears a Gln at this position (data not shown). Additionally, the p.Arg393Gln change was found in the Exome Variant Server, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) [June, 2012] with a frequency of 16/13,004 (0.12%).

At the genotype-phenotype level, our data showed that the class with more severe clinical presentations (class III) had a higher proportion of *EXT2* mutations than the other classes. However, it must be noted that this may be due to a relatively small number of patients with *EXT2* mutations in our study, all of whom bore truncating mutations. When the average number of exostoses in patients with different types of mutations was compared, a significant difference ( $p < 0.05$ ) was detected between missense mutations and other types of mutation (nonsense and small or large insertions and deletions). Patients with missense mutations had fewer osteochondromas than the rest. A hypothesis to explain this is that some residual activity of the mutant protein may remain only in the case of mutations of



amino acid change, which may be enough to produce a small amount of heparan sulfate. This is in agreement with the continuum model suggested by Berger et al.<sup>26</sup> which states that protein function can be a continuum related to the level of expression or activity of the tumour suppressor genes rather than to discrete step-by-step changes in gene copy number. One patient out of 39 developed a malignant tumour (2.6%). This figure is within the range of 2–5% described by several authors (see, for example, Bovee<sup>3</sup>; Pedrini et al.<sup>18</sup>). There were two other patients in whom no disease-causing mutation could be identified (5.1%). This proportion is lower than that found in most studies, including the large one by Pedrini et al.<sup>18</sup>. There are different explanations for the undetected mutations, including a possible third locus, the presence of mosaic point mutations gone undetected or the presence of mutations in unexplored regions such as the promoter, recently characterized by Jennes et al.<sup>27</sup>, or deep intronic.

Overall, our phenotype-genotype correlation results do not agree with those of Pedrini et al.<sup>18</sup>, which consisted of an association of a mild phenotype with female sex, *EXT2* mutations and absence of *EXT1/2* mutations. As stated above, the main limitation of our study was the small sample size. Comparisons between groups had not enough statistical power and we could not detect differences, for example, in the association between sex and the severity of the disease. The main challenge, therefore, will be to collect more cases to further investigate the genotype-phenotype correlation in Spanish patients.

To conclude, this is the first genetic study of MO performed in a Spanish cohort. We described a collection of mutations in *EXT1* and *EXT2* and it was possible to offer diagnosis and genetic counselling to the MO patients and their families. This is an essential first step, in order to gain insight into the bases of the disease and then to develop novel strategies in the search for possible therapies.

## Methods

**Patients.** In this study we investigated patients from 39 Spanish families with MO. Diagnosis, performed at 2 centres (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, n = 35 families, and Hospital Universitario "La Paz", Madrid, n = 4 families), was based on the presence of MO confirmed by physical and/or radiographic examinations. Blood samples were obtained from patients and available relatives for genomic DNA extraction, after informed consent. Samples from patients were obtained in accordance with the Helsinki Declaration, as revised in 2000. The experiments were approved by the Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Déu.

**Clinical studies.** A clinical diagnosis of MO was achieved after obtaining an accurate medical history and physically examining the patient, including the evaluation of all palpable lesions, height, long bone and trunk deformities, and functional limitations.

Patients were classified in three clinical classes based on the presence of deformities and functional limitations (I: no deformities and no functional limitations; II: deformities and no functional limitations; and III: deformities and functional limitations), as reported elsewhere<sup>6</sup>. The subcategories were defined by the number of osteochondromas (A: less than 20; B: more than 20).

**Genotyping and mutation analysis.** Genomic DNA mutation screening of the *EXT1* and *EXT2* genes was performed for each patient. New primers were designed to amplify all exons and flanking intronic regions of both the *EXT1* and the *EXT2* genes, so that all fragments, except those corresponding to exon 1 of *EXT1*, could be amplified by polymerase chain reaction (PCR) simultaneously. Primers are listed in on-line Supplementary Table S1. Exon 1 of *EXT1* and exon 4 of *EXT2* were split into several overlapping fragments, to obtain amplification products that did not exceed 650 bp. PCR was performed in a 50 µl reaction volume, containing ~100 ng of genomic DNA, 1× PCR buffer, 1–2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each forward and reverse primer and 0.7 U of GoTag<sup>®</sup> Flexi polymerase (Promega, Madison, WI). All PCR programs included an initial denaturation of 4 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 30 sec at 95 °C, 30 sec at annealing temperature (Ta) and 10 sec at 72 °C. Finally, an extension at 72 °C was performed for 5 min. Annealing temperature was 60 °C for all primer combinations, with the exception of primers for the amplification of overlapping regions of exon 1 of *EXT1*. For these primer combinations, Ta was set at 55 °C for ex1.1 and 57 °C for ex1.2 and ex1.3. After amplification, the PCR products were purified using a PCR purification kit (GE Healthcare) and then sequenced with BigDye 3.1 (Applied Biosystems; life technologies) in the following PCR programme: denaturation 1 min at 96 °C, 25 cycles of 10 sec at 96 °C, 5 sec at 55 °C and 4 min at 60 °C. The sequences were analyzed with an ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems life technologies). The presence of all the mutations detected was confirmed by digestion of each PCR product with the corresponding enzyme. None of the novel mutations

were found in 50 control samples. All chromatograms of *EXT1* and *EXT2* exons of negative cases were manually re-analyzed.

The mutations were given the official HGVS nomenclature (www.hgvs.org). As reference sequences, NM\_000127.2 for *EXT1* and NM\_000401.3 for *EXT2* were used.

**MLPA.** The number of copies of the *EXT1* and *EXT2* genes present in genomic DNA samples was analyzed by the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique designed by MRC-Holland. We used the commercial kit #P215-B1 and followed the manufacturer's instructions. PCR products were run on an ABI 3730 DNA Analyzer capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Peaks were analyzed by means of the Coffalyser v9.4 software. The proportion of each peak relative to the height of all peaks was calculated for each sample and then compared to proportions for the corresponding peak averaged for a set of at least ten normal DNA samples. Ratios of 1.0 were treated as normal copy number. Ratios below 0.6 were considered as deletions. Each positive result was confirmed in a second independent MLPA reaction.

**Assessment of functionality of missense mutations.** Disease causing potential of missense mutations was evaluated using two different bioinformatic tools: *SIFT* and *PolyPhen*<sup>19,20</sup>.

**Statistical analysis.** Normal distribution of the data and variance differences were assessed by the Kolmogorov-Smirnov and Lavenne tests, respectively. Assessment of mean differences was performed using ANOVA. A p value <0.05 was considered significant. The statistical analysis used the PASW 18.0 program.

- Schmale, G. A., Conrad, E. U. r. & Raskind, W. H. The natural history of hereditary multiple exostoses. *J Bone Joint Surg Am.* **76**, 986–992 (1994).
- Hennekam, R. C. Hereditary multiple exostoses. *J Med Genet.* **28**, 262–266 (1991).
- Bovee, J. V. Multiple osteochondromas. *Orphanet J Rare Dis.* **3**, 3 (2008).
- Ahn, J., Ludecke, H. J., Lindow, S., Horton, W. A., Lee, B. & Wagner, M. J. et al. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (*EXT1*). *Nat Genet.* **11**, 137–143 (1995).
- Stickens, D., Clines, G., Burbee, D., Ramos, P., Thomas, S. & Hogue, D. et al. The *EXT2* multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nat Genet.* **14**, 25–32 (1996).
- Wuyts, W., Van Hul, W., Wauters, J., Nemtsova, M., Reyniers, E. & Van Hul, E. V. et al. Positional cloning of a gene involved in hereditary multiple exostoses. *Hum Mol Genet.* **5**, 1547–1557 (1996).
- Ludecke, H. J., Ahn, J., Lin, X., Hill, A., Wagner, M. J. & Schomburg, L. et al. Genomic organization and promoter structure of the human *EXT1* gene. *Genomics.* **40**, 351–354 (1997).
- Clines, G. A., Ashley, J. A., Shah, S., Lovett, M. The structure of the human multiple exostoses 2 gene and characterization of homologs in mouse and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res.* **7**, 359–367 (1997).
- Bellaiche, Y., The, I. & Perrimon, N. Tout-velu is a *Drosophila* homologue of the putative tumour suppressor *EXT-1* and is needed for Hh diffusion. *Nature.* **394**, 85–88 (1998).
- Jennes, I., Pedrini, E., Zuntini, M., Mordenti, M., Balkassmi, S. & Asteggiano, C. G. et al. Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MOdb). *Hum Mutat.* **30**, 1620–1627 (2009).
- Bovee, J. V., Cleton-Jansen, A. M., Wuyts, W., Caethoven, G., Taminiau, A. H. & Bakker, E. et al. *EXT*-mutation analysis and loss of heterozygosity in sporadic and hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcomas. *Am J Hum Genet.* **65**, 689–698 (1999).
- de Andrea, C. E., Wiweger, M., Prins, F., Bovee, J. V., Romeo, S. & Hogendoorn, P. C. Primary cilia organization reflects polarity in the growth plate and implies loss of polarity and mosaicism in osteochondroma. *Lab Invest.* **90**, 1091–1101 (2010).
- Jones, K. B., Piombo, V., Searby, C., Kurriger, G., Yang, B. & Gräbellus, F. et al. A mouse model of osteochondromagenesis from clonal inactivation of *Ext1* in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 2054–2059 (2010).
- Francannet, C., Cohen-Tanugi, A., Le Merrer, M., Munnich, A., Bonaventure, J. & Legeai-Mallet, L. Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses. *J Med Genet.* **38**, 430–434 (2001).
- Porter, D. E., Lonie, L., Fraser, M., Dobson-Stone, C., Porter, J. R. & Monaco, A. P. et al. Severity of disease and risk of malignant change in hereditary multiple exostoses. A genotype-phenotype study. *J Bone Joint Surg Br.* **86**, 1041–1046 (2004).
- Alvarez, C. M., De Vera, M. A., Heslip, T. R. & Casey, B. Evaluation of the anatomic burden of patients with hereditary multiple exostoses. *Clin Orthop Relat Res.* **462**, 73–79 (2007).
- Kaput, J., Cotton, R. G., Hardman, L., Watson, M., Al Aqeel, A. I. & Al-Aama, J. Y. et al. Planning the human variome project: the Spain report. *Hum Mutat.* **30**, 496–510 (2009).
- Pedrini, E., Jennes, I., Tremosini, M., Milanese, A., Mordenti, M. & Parra, A. et al. Genotype-phenotype correlation study in 529 patients with multiple hereditary exostoses: identification of "protective" and "risk" factors. *J Bone Joint Surg Am.* **93**, 2294–2302 (2011).



19. Ng, P. C. & Henikoff, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* **11**, 863–874 (2001).
20. Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A. & Bork, P. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* **7**, 248–249 (2010).
21. Jennes, I., Entius, M. M., Van Hul, E., Parra, A., Sangiorgi, L. & Wuyts, W. Mutation screening of EXT1 and EXT2 by denaturing high-performance liquid chromatography, direct sequencing analysis, fluorescence in situ hybridization, and a new multiplex ligation-dependent probe amplification probe set in patients with multiple osteochondromas. *J Mol Diagn.* **10**, 85–92 (2008).
22. Reijnders, C. M., Waaijer, C. J., Hamilton, A., Buddingh, E. P., Dijkstra, S. P., Ham, J. *et al.* No haploinsufficiency but loss of heterozygosity for EXT in multiple osteochondromas. *Am J Pathol.* **177**, 1946–1957 (2010).
23. Signori, E., Massi, E., Matera, M. G., Poscente, M., Gravina, C. & Falcone, G. *et al.* A combined analytical approach reveals novel EXT1/2 gene mutations in a large cohort of Italian multiple osteochondromas patients. *Genes Chromosomes Cancer.* **46**, 470–477 (2007).
24. Szuhai, K., Jennes, I., de Jong, D., Bovee, J. V., Wiweger, M. & Wuyts, W. *et al.* Tiling resolution array-CGH shows that somatic mosaic deletion of the EXT gene is causative in EXT gene mutation negative multiple osteochondromas patients. *Hum Mutat.* **32**, E2036–2049 (2011).
25. Dobson-Stone, C., Cox, R. D., Lonie, L., Southam, L., Fraser, M. & Wise, C. *et al.* Comparison of fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis and denaturing high-performance liquid chromatography for detection of EXT1 and EXT2 mutations in hereditary multiple exostoses. *Eur J Hum Genet.* **8**, 24–32 (2000).
26. Berger, A. H., Knudson, A. G. & Pandolfi, P. P. A continuum model for tumour suppression. *Nature.* **476**, 163–169 (2011).
27. Jennes, I., Zuntini, M., Mees, K., Palagani, A., Pedrini, E. & De Cock, G. *et al.* Identification and functional characterization of the human EXT1 promoter region. *Gene.* **492**, 148–159 (2012).
28. Philippe, C., Porter, D. E., Emerton, M. E., Wells, D. E., Simpson, A. H. & Monaco, A. P. Mutation screening of the EXT1 and EXT2 genes in patients with hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet.* **61**, 520–528 (1997).
29. Raskind, W. H., Conrad, E. U., 3rd, Matsushita, M., Wijnsman, E. M., Wells, D. E. & Chapman, N. *et al.* Evaluation of locus heterogeneity and EXT1 mutations in 34 families with hereditary multiple exostoses. *Hum Mutat.* **11**, 231–239 (1998).
30. Seki, H., Kubota, T., Ikegawa, S., Haga, N., Fujioka, F. & Ohzeki, S. *et al.* Mutation frequencies of EXT1 and EXT2 in 43 Japanese families with hereditary multiple exostoses. *Am J Med Genet.* **99**, 59–62 (2001).
31. Heinritz, W., Huffmeier, U., Strenge, S., Mitterski, B., Zweier, C. & Leinung, S. *et al.* New Mutations of EXT1 and EXT2 Genes in German Patients with Multiple Osteochondromas. *Ann Hum Genet.* (2009).
32. Lonie, L., Porter, D. E., Fraser, M., Cole, T., Wise, C. & Yates, L. *et al.* Determination of the mutation spectrum of the EXT1/EXT2 genes in British Caucasian patients with multiple osteochondromas, and exclusion of six candidate genes in EXT negative cases. *Hum Mutat.* **27**, 1160 (2006).

## Acknowledgements

We thank the patients and their families for their enthusiastic participation. The authors are also grateful for the support from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), which is an initiative of the ISCIII. This study was funded in part by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2010-15707, SAF2011-25431 and PIB2010AR-00473) and from the Generalitat de Catalunya (2009SGR 971). PS was supported by a grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FPI).

## Author contributions

Study design: R.A., J.An., M.A.V., C.G.A., S.B., D.G. Collection of data and samples: P.S., A.S., L.M., J.Ar., F.T., J.N. Performance of experiments: P.S., R.U., A.D., J.N., P.L. Data interpretation and analysis: P.S., R.A., P.L., S.B., D.G. Draft composition: P.S., R.A., D.G., S.B. All authors reviewed the manuscript.

## Additional information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**License:** This work is licensed under a Creative Commons

Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

**How to cite this article:** Sarrión, P. *et al.* Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in Spanish patients with multiple osteochondromas. *Sci. Rep.* **3**, 1346; DOI:10.1038/srep01346 (2013).

## My Account **Manuscript(s)** **Manuscript(s)**

Submitted:

*You have no submitted manuscripts*

Accepted (1):

Published (2):

[Metrics Order Reprints](#)

[Submit Manuscript](#)

Personal profile Professional profile **Manuscript(s)**

22nd July 2014

*Scientific Reports*

**SREP-13-06273B**

22nd July 2014

*Scientific Reports*

A BROAD SPECTRUM OF GENOMIC CHANGES IN LATIN AMERICAN PATIENTS WITH EXT1/EXT2-CDG

Corresponding Author

*Scientific Reports: Decision letter for SREP-13-06273B*

scientificreports@nature.com

Para: asteggianocarla@hotmail.com

Dear Dr Asteggiano,

We are delighted to accept your manuscript entitled "A BROAD SPECTRUM OF GENOMIC CHANGES IN LATIN AMERICAN PATIENTS WITH EXT1/EXT2-CDG" for publication in Scientific Reports. Thank you for choosing to publish your work with us.

Please ensure that you complete and return the license to publish form and the open access payment form for your region, by email to scientificreports@nature.com. These forms are mandatory; your paper cannot be published until both forms have been received.

A BROAD SPECTRUM OF GENOMIC CHANGES IN  
LATINAMERICAN PATIENTS WITH EXT1/EXT2-CDG

M.A. Delgado<sup>1</sup>; G. Martinez-Domenech <sup>1</sup>; P. Sarrión. <sup>2</sup>; R. Urreizti .<sup>2</sup>; L.  
Zecchini.<sup>3</sup>; H.H. Robledo.<sup>4</sup>; F. Segura.<sup>5</sup>; R. Dodelson de Kremer .<sup>1</sup>; S.  
Balcells. <sup>2</sup>; D. Grinberg <sup>2</sup>; C.G. Asteggiano <sup>1,6,7\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO),  
Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Hospital  
de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina, <sup>2</sup>Universitat de  
Barcelona, IBUB, Centro de Investigación Biomédica en Red de  
Enfermedades Raras (CIBERER), Departament de Genética, Facultat de  
Biología, Barcelona, España, <sup>3</sup>Servicio de Traumatología, Hospital de Niños  
de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina, <sup>4</sup>Servicio de Bioimágenes,  
Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba, Argentina, <sup>5</sup>II<sup>da</sup>  
Cátedra de Ortopedia y Traumatología, Facultad de Ciencias  
Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, <sup>6</sup>Cátedra de  
Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba,  
Argentina, <sup>7</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas  
(CONICET), Argentina

*\*Corresponding author: Carla G. Asteggiano (PhD)*

*E-mail: [asteggianocarla@hotmail.com](mailto:asteggianocarla@hotmail.com)*

*Address:* Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO),  
Universidad Nacional de Córdoba, Hospital de Niños de la Santísima  
Trinidad. Tel: 54-531-4586473 / Fax: 54-531-4586439. Ferroviarios 1250,  
CP: X5014AKN Córdoba, ARGENTINA

**Multiple osteochondromatosis (MO), or EXT1/EXT2-CDG, is an autosomal dominant O-linked glycosylation disorder characterized by the formation of multiple cartilage-capped tumors (osteochondromas). In contrast, solitary osteochondroma (SO) is a non-hereditary condition. EXT1 and EXT2, are tumor suppressor genes that encode glycosyltransferases involved in heparan sulfate elongation. We present the clinical and molecular analysis of 33 unrelated Latin American patients (27 MO and 6 SO). Sixty-three percent of all MO cases presented severe phenotype and two malignant transformations to chondrosarcoma (7%). We found the mutant allele in 78% of MO patients. Ten mutations were novel. The disease-causing mutations remained unknown in 22% of the MO patients and in all SO patients. No second mutational hit was detected in the DNA of the secondary chondrosarcoma from a patient who carried a nonsense EXT1 mutation. Neither EXT1 nor EXT2 protein could be detected in this sample. This is the first Latin American research program on EXT1/EXT2-CDG.**

Multiple osteochondromatosis (MO; MIM# 133700, 133701), also known as *EXT1/EXT2*-CDG in the Congenital Disorder of Glycosylation (CDG) nomenclature<sup>1,2</sup> is an autosomal dominant disease. MO is genetically heterogeneous and 70–90% of patients present mutations in one of two genes: *EXT1* (MIM 608177) (8q24.11-q24.13)<sup>3</sup> or *EXT2* (MIM 608210) (11p12-p11)<sup>4,5</sup>. Both are ubiquitously expressed tumor-suppressor genes of the EXT gene family. All members of this gene family have been cloned and encode glycosyltransferases involved in the adhesion and/or polymerization of heparan sulfate chains (HS)<sup>6,7,8,9,10</sup>.

Heparan sulfate proteoglycans (HSPG) are ubiquitously expressed at cell surfaces and in extracellular matrices. They are composed of a core protein and one or more heparan sulfate glycosaminoglycan chains (linear polysaccharides formed by alternating N-acetylated or N-sulfated glucosamine units and uronic acid) that interact with numerous proteins, including growth factors, morphogens and extracellular matrix proteins<sup>11</sup>. Each HS binds to a serine unit of a proteoglycan core protein via O-linked-xylosylation binding<sup>11,12</sup>. The truncated HSPG disturb specific growth-factor-binding in chondrocytes, resulting in abnormal signaling and altered endochondral ossification, thus leading to MO<sup>13</sup>.

MO is characterized by the formation of multiple cartilaginous tumors (osteochondromas), that mainly affect the metaphyses of long bones or the

surface of flat bones<sup>14, 15, 16, 17, 18</sup>. Complications may involve bone and surrounding tissue deformities, fractures or mechanical joint problems, vascular compression, arterial thrombosis, aneurysm, pseudoaneurysm formation, and venous thrombosis. Pain, acute ischemia, signs of phlebitis or nerve compression occur alongside the most severe complication, the malignant transformation of osteochondroma to secondary peripheral chondrosarcoma (0.5–5% of patients)<sup>16,17,18, 19,20, 21,22,23</sup>. *EXT1* and *EXT2* have been analysed using different techniques to search for point mutations and structural alterations. Intragenic deletions involving single or multiple exons of *EXT1* or *EXT2* genes have been found in about 10% of cases<sup>24,25,26,27,28,29</sup>. Additionally, the promoter of *EXT1* was analysed in some cases. The *EXT1* core promoter region was reported to map to approximately –917 bp upstream of the *EXT1* start codon, within a 123-bp region<sup>30</sup>. One SNP within this region, rs34016643, was shown to have a significant effect on *EXT1* promoter activity (the C-allele resulting in a 56% rise in promoter activity) compared to the G-wild-type allele<sup>30</sup>. The presence of an additional MO-causing gene has been proposed to explain the absence of an *EXT1* or *EXT2* mutation in a small percentage of MO patients (15–30%)<sup>17,31,32</sup>. To date, more than 600 different *EXT1* and 345 *EXT2* mutations have been found worldwide and an update on all reported mutations is deposited at <http://medgen.ua.ac.be/LOVD>)<sup>20</sup>.

This study represents the first Latin American research program in MO, with a broad spectrum of genomic changes detected, including 10 novel pathogenic mutations identified in *EXT1/EXT2*-CDG patients. Twenty-one different mutant alleles in the *EXT1* or *EXT2* genes were found in a cohort of 27 MO patients, most of them with a severe phenotype, including two patients with malignant transformation to chondrosarcoma. No mutation was found in six MO patients after performing sequencing and MLPA analyses.

## Results

**Phenotypic characterization.** We observed multiple osteochondromas in 27 out of 33 patients, who ranged from 3 to 55 years at diagnosis. Orthopedic deformities of the forearm, shortening of limbs, ankle, varus or valgus of the knee, short metacarpal bones, scoliosis, synostosis, arthritis, and vessel or nerve compression were some common manifestations (Figure 1). The lesions were located in the femur (71%), tibia (67%), humerus (67%), fibula (62%), radius (52%) and pelvis (29%), a frequent site of malignant transformation to chondrosarcoma. Phenotypic data were available for 78% of the MO patients (n=21), of whom four presented with a moderate phenotype (15% of all MO patients) and 17 with a severe presentation of the disease (63% of all MO patients) (Table 1, Figure 2A).

A severe phenotype ranging from grade IS to IVS was observed in most of the MO patients (Figure 2B). Seventy six percent of them presented an age of onset below 5 years and 59% manifested familial inheritance (Table 1). Two patients developed malignant transformation as a large chondrosarcoma on the pelvis that led to severe vascular and organ compression: P06, a 32 year-old female with a type IV severe phenotype, reported by Delgado et al. (2012) and P38, a 42 year-old male with a type IIS severe phenotype (Table 1, Figure 1A and B)<sup>22</sup>.

**Gene sequence and dose analyses of *EXT1* and *EXT2* exons.** Exons and flanking regions of the *EXT1* and *EXT2* genes were sequenced from the genomic DNA of the 33 patients and MLPA analysis was performed in DNA samples of those with negative results for sequencing analysis. The mutant allele was found in 78% of the MO patients including one patient with solitary presentation (P36) (Table 1). We identified 21 pathogenic mutations, 15 in *EXT1* and 6 in *EXT2* (five nonsense, six frame-shift, four missense, three splice-site mutations, and three large deletions identified by MLPA) listed in Table 2. Six of the *EXT1* mutations were novel (p.Val78Glyfs\*111, p.Leu264Pro, p.Lys306\*, p.Arg346Thr, c.1164+1C>A, and p.Gln583Arg) as were four of the *EXT2* mutant alleles (p.Asp307Valfs\*45, p.Trp394\*, p.Asp539Glnfs\*5 and a deletion of exon 4 to 14).

Bioinformatic predictions for the *EXT1* missense mutations suggested a pathogenic role for these genomic changes. In particular, the p.Leu264Pro change was considered “*disease causing*” by Mutation Taster (score: 0.999, amino acid sequence changed, protein features might be affected with potential luminal loss and splice site changes) and “*probably\_damaging*” by PolyPhen2 (score: 0.997 sensitivity: 0.27; specificity: 0.98), while ESE Finder predicted an increased level of the enhancer splicing proteins SF2/ASF (score changed from -0.21685 to 1.24048), and SF2/ASF (score changed from 0.4979 to 1.75265). The novel missense mutation, p.Arg346Thr, change from a basic amino acid (Arg) to a non-polar one (Thr) and it was predicted to be “*disease causing*” by Mutation Taster (score 0.999, amino acid sequence changed, protein features might be affected with potential luminal loss and splice site changes) and “*probably\_damaging*” by PolyPhen2 (score: 0.993, sensitivity: 0.47; specificity: 0.96). ESE Finder predicted diminished levels of enhancer splicing protein SRSF2 (SC35). The other novel *EXT1* missense mutation, p.Gln583Arg, is a change from an uncharged polar amionacid (Gln) to a basic one (Arg) and it was predicted to be “*disease causing*” by Mutation Taster (score: 0.999, amino acid sequence changed, protein features might be affected with potential luminal loss and splice site changes) although PolyPhen2 predicted it to be “*benign*” (score: 0.002 sensitivity: 0.99; specificity: 0.30). The Protein Homology Fold Recognition Engine Phyre2, (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html>, last

accessed March 2014) was used to predict the effect of missense mutations on 3D structure and the missense mutation p.Arg346Thr removes two fragments of alpha helix between aa 345 and 347, and from aa 635 to 639, and a beta sheet from aa 361 to 368 in EXT1 protein. The p.Leu264Pro mutation adds an alpha helix structure from aa 161 to 166 and removes an alpha helix from aa 344 to 346, while removing a beta sheet structure from aa 360 to 365 and introducing a segment of beta sheet from aa 724 to 726. The other novel missense mutation, p.Gln583Arg removes two fragments of alpha helix between aa 39 and 41, and from aa 635 to 639 in the EXT1 protein.

*In silico* analyses for one novel intronic mutation (c.1164+1 G>A) predicted the use of cryptic donor splice sites: Human Splice Finder (<http://www.umd.be/HSF/>, last accessed March 2014), considered the use of a cryptic donor splice site (score: 91.85%) located 74 nucleotides downstream from the wild-type sequence, while NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface?jobid=netgene2/> last accessed March 2014) predicted the use of a cryptic donor splicing site (score: 0.76) 201 nucleotides downstream from the wild-type (score:0.83).

In three patients large deletions were detected by MLPA (Tables 1 and 2). In *EXT1* (exon 1, P36) and a deletion of 11 exons (6–16) in (P12), and the third one was a deletion in *EXT2* (exon 6, P04). Normal MLPA profiles were obtained for 19 patients.

No mutation was found in 12 cases (6 MO and 6 SO) after performing sequencing and MLPA analyses. Most of these patients did not have a positive family history of osteochondromatosis (Table 1).

**Analysis of the *EXT1* promoter.** We sequenced 435 bp upstream of the *EXT1* gene including the 123-bp region described to contain the basic promoter elements<sup>30</sup> in samples from patients and 9 controls, but no mutation was detected. We found that four patients (P18, P21, P34 and P41), and one control individual, were heterozygous carriers of the C allele of SNP rs34016643, which has been previously shown to have a significant effect on *EXT1* promoter activity, with the C-allele resulting in a 56% rise in promoter activity compared to the G (wild-type) allele<sup>30</sup>. No pathogenic mutation was identified in *EXT1* or *EXT2* in three of these four patients, while patient P41 bore a nonsense mutation (c.1219C>T, p.Gln407\*) in exon 4 of the *EXT1* gene (Table 1).

**Loss of heterozygosity analysis in a chondrosarcoma.** We had access to a chondrosarcoma sample from P06. We have detected the heterozygous p.L283\* mutation in *EXT1* in the tumor sample. We further analysed both genes by MLPA and we did not detect any dose alteration in the chondrosarcoma from this patient. The patient was heterozygous for the single nucleotide polymorphism rs11546829 in exon 3 of the *EXT1* gene.

Loss of heterozygosity for this marker was not observed in the analysis of DNA in the tumor tissue.

## Discussion

This work represents the first clinical, biochemical and molecular research on multiple hereditary osteochondromatosis (EXT1/EXT2-CDG) in Latin American patients. Thirty-three unrelated patients were studied, 27 of which presented with MO. The mutant allele was identified in 21 of these patients (78%). *EXT1* mutations (71%) were more common than *EXT2* mutations (29%) and most of the *EXT1* mutations were located in the first six exons. These results are consistent with recent studies reporting that *EXT1* is responsible for ~65–75% of MO cases<sup>20,27</sup>.

The 67% of *EXT1* mutations (10/15), were located in exon 1 or 2, which encode the exostosin domain of the EXT1 protein (from amino acid 111 to 396). Most of these patients presented a severe phenotype (67%). Twenty per cent of *EXT1* mutations (n=3) were located in the glycosyltransferase domain (from amino acid 480 to 729) (Table 2). In contrast, *EXT2* mutations (n=6) were more frequent in the last exons. Thirty three per cent of the *EXT2* mutations (n=2) were found in the exons that encode the glycosyltransferase domain (from exon 10 to 14) (Table 2). The structure of the different EXT1 and EXT2 protein domains was analyzed using Phyre2 to predict a decrease or loss of protein function according to

the detected mutations and the altered structure of protein domains<sup>32</sup> (Protein Homology Fold Recognition Engine, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Regarding the 3-D prediction for two novel *EXT1* missense mutations, p.Leu264Pro and p.Arg346Thr, the Phyre2 bioinformatic tool showed that both mutations produce impairment in protein folding or alterations in the exostosin or glycosyltransferase domains. For the third one, p.Gln583Arg, Phyre2 showed the removal of alpha helix structures with possible alterations in *EXT1* glycosyltransferase domain. A type II severe phenotype (IIS) was found in patients carrying the two first missense mutations (P17 and P08), and a severe phenotype (IIIS) was observed in P25 carrying the p.Gln583Arg mutation.

Six out of the 14 mutations in the *EXT1* gene (p.Val78Glyfs\*111, p.Leu264Pro, p.Lys306\*, p.Arg346Thr, c.1164+1C>A and p.Gln583Arg) and four of the six *EXT2* mutant alleles (p.Asp307Valfs\*45, p.Trp394\*, p.Asp539Glnfs\*5, and exon4-14del) were novel. Although some mutation hotspots have been reported<sup>20</sup> (<http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>), we did not observe recurrent *EXT1* or *EXT2* mutations in patients in this study. The missense mutation c.1018C>T (p.Arg340Cys) observed in P40 and the exon 6 deletion c.1469delT (p.Leu490Argfs\*9) found in P02 were previously described to cause the impairment of heparan sulfate synthesis<sup>20,33</sup>.

The MLPA analysis in gDNA of patient P36, showed the complete deletion of *EXT1* exon 1. This patient had previously been reported as an SO case because he only had one lesion, but this detection in germline DNA allow us to change the diagnosis into MO patient with very mild symptoms (only a single osteochondroma lesion)<sup>33</sup> (Table 1 and 2). Two molecular defects in *EXT2* were detected by MLPA: the deletion of exon 6 (P04) and of 10 exons (from exon 4 to exon 14) in patient P12. This patient also carried an abnormal karyotype (an 18q deletion).

Splice-site mutations were detected in *EXT1* in two patients. One of them, c.1164+1G>A in intron 3, was a novel mutation observed in patient P28. This novel mutation was analyzed *in silico* and the use of alternative cryptic donor sites was predicted. The phenotype in these patients was severe, presenting deformity of the limbs, valgus, restricted joint movement and scoliosis. Furthermore, one splice site mutation previously described was detected in P19 in *EXT2*. Clinical data were not available for this patient<sup>25</sup>, There are several possible explanations for the lack of identification of mutations in some of the MO patients (22%). The mutation may have been in the *EXT1* or *EXT2* genes but in regions that were not analyzed. We did not look for mutations in deep intronic regions or in the 5' and 3' UTR sequences. Instead, the promoter region was genotyped and no mutation was detected. A recent study described a regulatory role for a G/C SNP (rs3401643) located at position -1158 bp,

within a USF1 transcription factor binding site<sup>30</sup>. These authors observed that the presence of the C-allele resulted in a ~56% increase in *EXT1* promoter activity. The effect of this allele in the four patients of the present study who are heterozygous for it will require further studies. It is well established that methylation of cytosine residues in the promoter region leads to transcription repression in tumor suppressor genes; nevertheless this does not seem to be the case for *EXT1* and *EXT2* promoters in osteochondromas or in chondrosarcomas<sup>34,35</sup>. Finally, the possible existence of other genes responsible for MO should also be considered. A putative *EXT3* gene, located on the short arm of chromosome 19, has been proposed to explain the absence of an *EXT1* or *EXT2* mutation in a small percentage of MO patients (15–30%). Nevertheless, the existence of this third locus is generally accepted to be a false linkage result.

Inactivating mutations in the *EXT1* and *EXT2* genes were previously reported as the most common event in MO patients resulting in the formation of non-functional *EXT1* or *EXT2* proteins with a variable degree of expression in tissues<sup>27,36</sup>. We observed 11 truncating mutations that create premature stop codons presenting a high grade of severity in patient's phenotype (Table 1 and 2). One of these patients (P06) presented malignant transformation to chondrosarcoma and we detected the p.Leu283\* mutation in the *EXT1* gene. *Very low or null levels of EXT1 and*

*EXT2* proteins were detected by Western blot in this patient. However, in these experiments, the bands corresponding to GAPDH (control protein) were very weak and the lack of additional sample precluded repetition. We think that in spite of the technical problems, this observation should be reported to allow comparisons with other studies. Obviously, further cases should be analyzed to confirm these findings. The loss of *EXT2* protein suggests that *EXT1* mutations probably interfere with the function of exostosin's complexes in the Golgi, inactivating the holoenzyme, degrading the whole protein, or interfering in some other function in the Golgi<sup>37</sup>.

Several studies have suggested that MO patients present a more severe phenotype due to *EXT1* mutations than *EXT2* mutations<sup>16,18,21</sup> while other studies could not confirm this observation<sup>23,36</sup>. Pedrini et al 2011 recently performed a genotype–phenotype association study in a large cohort of MO patients and identified some specific correlation according to a new clinical classification system<sup>31</sup>. Our patients presented some of the most common manifestations, including orthopedic deformities of the forearm, ankle, varus or valgus of the knee, arthritis, vessels and nerve compression and very short stature (below the third percentile). The bones most often affected were tibia, femur, radius, humerus and fibula. Nevertheless, we observed a severe phenotype (12% type IS, 53% type IIS, 12% type IIIS and 23% type IVS) in 63% of MO patients (Figure 2). The remaining 15% presented with a

moderate phenotype without a family history of the disease. We observed that the grade of severity differed between the proband and other affected members in the family, according to previously reported intra-familial variability<sup>18, 38</sup>. Nevertheless, no family history for MO was reported in 56% of MO patients. Patients with a mutation in the *EXT2* gene showed a smaller number of affected bones (data not shown) consistent with a recent study<sup>39</sup>. The most frequently observed skeletal deformations in our patients were shortening of limbs, varus or valgus knee, short metacarpal bones, scoliosis, shortened stature and synostosis, with no evidence of differences between the grade of severity in the phenotype observed in patients with *EXT1* or *EXT2* (Figure 2). Genotype–phenotype correlations are difficult to establish in MO patients because most of the *EXT1* and *EXT2* variants are private mutations<sup>20</sup>.

Malignant transformation to a chondrosarcoma is the most important complication in MO, and has been estimated to occur in 0.5–5% of patients<sup>17</sup>. Patients P06 and P38 developed malignant tumors, which gives a frequency of malignant transformation of 7% in our cohort of patients. Patient P06 bore the pathogenic mutation c.848T>A (p.Leu283\*) in the first exon of the *EXT1* gene<sup>22</sup>, while no mutation was detected in P38, neither in *EXT1* nor *EXT2* (Table 1). It has been shown that hereditary osteochondromas and secondary chondrosarcomas are associated with a second mutational hit in the EXT genes<sup>40,41</sup>. We thus investigated this

possibility in DNA extracted from the osteochondroma tissue resected from P06 by Sanger sequence and MLPA but we found no evidence of a somatic mutation as a second hit in any of these genes. The presence of genetic rearrangements at the *EXT1* and *EXT2* loci (as the second mutational hit) in P06 osteochondromas and secondary chondrosarcomas was ruled out.

In conclusion, we have identified the disease-causing mutation in 21 out of 27 MO patients, including 10 mutations described for the first time. No mutation was identified in SO cases. Structural analyses predicted a disruption of important domains of EXT1 proteins bearing missense mutations. A potentially functional promoter polymorphism was found in three patients with no other mutation, in one patient with a disease-causing mutation and in one control. No second hit was identified in a sample from a chondrosarcoma. Further studies are needed to identify the molecular bases of the disease in 22% of the patients of this cohort and to understand the mechanisms underlying the malignant transformation process.

## Methods

**Patients and control individuals.** We investigated 33 patients (18 males and 15 females), from unrelated pedigrees with osteochondromatosis from Chile and Argentina (27 MO and 6 SO). Nine control samples from healthy subjects were included in the promoter studies. Diagnosis was made on the basis of clinical manifestations and confirmed by physical and/or

radiographic examinations at the Orthopedic and Imaging Departments, Children's Hospital of Córdoba, National University of Córdoba, Argentina. DNA and tissues samples from patients and their relatives were obtained together with their informed consent in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2000. The study was approved by the Ethics Committee (CIEIS) Act N° 95/2007. Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes and tissue samples from discarded tissues obtained by surgery, using the Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega, Madison, WI). DNA was extracted according to the manufacturer's instructions.

**Clinical studies and phenotypic data.** Clinical variables were analyzed according to a scale established by the Musculoskeletal Tumoral Society with some modifications<sup>18</sup>. This scale includes the evaluation of all palpable lesions, patient's height, deformities, and functional limitations. Lesion quality and the severity of the disease were assessed according to age of onset (before/after 3 years), number of exostoses (more/less than 10 osteochondromas), vertebral location of the exostoses (absence or presence), stature (above/below 10<sup>th</sup> percentile), and functional rating (good or fair). The degree of severity was classified as mild (M) or severe (S). Four subcategories were defined in patients with a severe phenotype (from types IS to IVS)<sup>16,18</sup>.

**Genotyping and mutation analysis.** The 11 *EXT1* and 13 *EXT2* coding exons and their intronic flanking regions were amplified by PCR from genomic DNA. Primer sequences and PCR conditions were as described by Sarrión et al 2013<sup>42</sup>. All fragments, except those corresponding to exon 1 of *EXT1*, could be amplified by PCR simultaneously. Exon 1 of *EXT1* and exon 2 of *EXT2* were split into several overlapping fragments, to obtain amplification products that did not exceed 650 bp. PCR was performed in a 50- $\mu$ l reaction volume, containing ~100 ng of genomic DNA, 1–2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.4  $\mu$ M of each forward and reverse primer and 0.7 U of GoTaqR Flexi polymerase (Promega, Madison, WI). All PCR programs included an initial denaturation of 4 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at annealing temperature (Ta) and 1 min at 72°C. An extension at 72°C was then performed for 5 min. The annealing temperature was 60°C for all primer combinations, except during the amplification of overlapping regions of exon 1 of *EXT1*. For these primer combinations, Ta was set at 55°C for ex1.1 and 57°C for ex1.2 and ex1.3. The *EXT1* promoter region, between positions -1285 and -851, was also analyzed by sequencing. The PCR reaction was performed as described above with a Ta of 55°C. All PCR products were purified using a PCR purification kit (GE Healthcare) and sequenced with BigDye 3.1 (Applied

Biosystems Life Technologies). The sequences were analyzed in an ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems Life Technologies).

The presence of all detected mutations was confirmed by digestion with the appropriate restriction enzyme. Novel mutations were confirmed by analyzing 100 control alleles. The mutations were given the official HGVS nomenclature ([www.hgvs.org](http://www.hgvs.org)). The reference sequences were NM\_000127.2 for *EXT1* and NM\_000401.3 for *EXT2*.

**MLPA.** The number of copies of the *EXT1* and *EXT2* exons present in the patient's genomic DNA was analyzed using the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique designed by MRC-Holland (code #P215-B1 EXT, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) following the manufacturer's instructions. PCR products were run on an ABI 3730 DNA Analyzer capillary sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). Peaks were analyzed using Coffalyser v9.4 software (MRC-Holland Vs 05; 30-08-2007). The proportion of each peak relative to the height of all peaks was calculated for each sample and then compared to proportions for the corresponding peak averaged for a set of at least ten normal DNA samples. Samples with ratios between 0.7 and 1.3 were considered as bearing a normal copy number. Ratios below 0.7 were considered to correspond to deletions, and above 1.3 to duplications. Each positive result was confirmed in a second independent MLPA reaction.

**Assessment of functionality of missense mutations.** In order to assess the possible pathogenic effect of the new missense mutations, the changes were analyzed using three in-silico online tools: PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, last accessed March 2014), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>, last accessed March 2014), and ESE Finder 3.0 (ESE: Exonic Splicing Enhancer; <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>, last accessed March 2014). Protein Homology Fold Recognition Engine (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html>, last accessed March 2014) was used to predict the implications of missense mutations for EXT1 3D structure. Human Splice Finder (<http://www.umd.be/HSF/>, last accessed March 2014) and NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface?jobid=netgene2>, last accessed March 2014) online tools were used to assess the possible effect of novel intronic mutations on splicing.

### **Additional Information**

**Acknowledgments:** The authors thank the patients and their families for their cooperation. They wish to acknowledge Joanne Ferrier for revising the English. The authors are also grateful for the support from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), which is an initiative of the ISCIII. Grant support: Scientific and Technical

National Research Council (CONICET); FONCyT PICT 2006-2350 and BID N° 2437/ OC-AR PICT2010-2824, Catholic University of Cordoba Grant 2010/2011/2012/2013, Spanish Ministry of Education and Science (SAF2011-25431, PIB2010AR00473) and the Catalan Government (2009SGR971).

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Ethics statement:** The methods were carried out in accordance with the approved guidelines and in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2000. The study was approved by the Ethics Committee (CIEIS) Act N° 95/2007.

1. Martinez-Duncker, I., Asteggiano, C. & Freeze, H. H. [Congenital Disorders of Glycosylation] [59-83] [Biochemistry Research Trends, Nova Science Publishers Inc Nueva York, 2012].
2. Jaeken, J. Congenital disorders of glycosylation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1214**, 190-198 (2010).
3. Ahn, J. *et al.* Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat. Genet.* **11**, 137–143 (1995).
4. Stickens, D. *et al.* The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nat Genet.* **14**, 25–32 (1996).
5. Wuyts, W. *et al.* Positional cloning of a gene involved in hereditary

- multiple exostoses. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1547– 1557 (1996).
6. Busse, M. *et al.* Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *J. Biol. Chem.* **282**, 32802– 32810 (2007).
  7. Kim, B. T. *et al.* Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- Nacetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 7176-7181 (2001).
  8. Van Hul, W. *et al.* Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family. *Genomics.* **15**; 47, 230-7 (1998).
  9. Wuyts, W. *et al.* Identification and characterization of a novel member of the EXT gene family, EXTL2. *Eur J Hum Genet.* **5**, 382-9(1997).
  10. Wise, C.A., Clines, G.A., Massa, H., Trask, B.J. & Lovett, M. Identification and localization of the gene for EXTL, a third member of the multiple exostoses gene family. *Genome Res.*, **7**, 10-16 (1997).
  11. Gallagher, J. & Lyon, M. Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem. J.* **236**, 313-325 (1986).
  12. Carlsson, P., Presto, J., Spillmann, D., Lindahl, U. & Kjellén, L. Heparin/heparan sulfate biosynthesis: processive formation of N-sulfated domains. *J. Biol. Chem.*, **283**, 20008–20014 (2008).
  13. Shi, X. & Zaia, J. Organ-specific heparan sulfate structural phenotypes. *J. Biol. Chem.* **284**, 11806-11814 (2009).
  14. Zak, B.M., Crawford, B.E., & Esko, J.D. Hereditary multiple

- exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1573**, 346-355 (2002).
15. De Andrea, C. E. & Hogendoorn, P. C. Epiphyseal growth plate and secondary peripheral chondrosarcoma: the neighbours matter. *J. Pathol.* **226**, 219-228 (2012).
16. Alvarez, C., Tredwell, S., De Vera, M. & Hayden, M. The genotype-phenotype correlation of hereditary multiple exostoses. *Clin. Genet.* **70**, 122–130 (2006).
17. Bovée, J. V. Multiple osteochondromas. *Orphanet J. Rare Dis.* **13**, 3 (2008).
18. Francannet, C. *et al.* Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses. *J. Med. Genet.* **38**, 430-434 (2001).
19. Hameetman, L., Bovée, J. V., Taminiau, A. H., Kroon, H. M. & Hogendoorn, P. C. Multiple osteochondromas: clinicopathological and genetic spectrum and suggestions for clinical management. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **2**, 161-173 (2004).
20. Jennes, I. *et al.* Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MOdb). *Hum. Mutat.* **30**, 1620–1627 (2009).
21. Alvarez, C. M., De Vera, M. A., Heslip, T. R. & Casey, B. Evaluation of the anatomic burden of patients with hereditary multiple exostoses. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **462**, 73–79 (2007).

22. Delgado, M. A. *et al.* A novel nonsense mutation of the EXT1 gene in an Argentinean patient with multiple hereditary exostoses: a case report. *J. Bone Joint Surg. Am.* **94**, e76 (2012).
23. Kitsoulis, P. *et al.* Osteochondromas: review of the clinical, radiological and pathological features. *In Vivo* **22**, 633-646 (2008).
24. Jennes, I. *et al.* Mutation screening of EXT1 and EXT2 by denaturing high-performance liquid chromatography, direct sequencing analysis, fluorescence in situ hybridization, and a new multiplex ligation-dependent probe amplification probe set in patients with multiple osteochondromas. *J. Mol. Diagn.* **10**, 85-92 (2008).
25. Vink, G. R. *et al.* Mutation screening of EXT1 and EXT2 by direct sequence analysis and MLPA in patients with multiple osteochondromas: splice site mutations and exonic deletions account for more than half of the mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* **13**, 470-474 (2005).
26. Lonie, L. *et al.* Determination of the mutation spectrum of the EXT1/EXT2 genes in British Caucasian patients with multiple osteochondromas, and exclusion of six candidate genes in EXT negative cases. *Hum. Mutat.* **27**, 1160 (2006).
27. Pedrini, E. *et al.* Novel EXT1 and EXT2 mutations identified by DHPLC in Italian patients with multiple osteochondromas. *Hum. Mutat.* **26**, 280 (2005).
28. White, S. J., Sterrenburg, E., van Ommen, G. J., den Dunnen, J. T. &

- Breuning, M. H. An alternative to FISH: detecting deletion and duplication carriers within 24 hours. *J. Med. Genet.* **40**, e113 (2003).
29. Wuyts, W. *et al.* Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 346-354 (1998).
30. Jennes, I. *et al.* Identification and functional characterization of the human EXT1 promoter region. *Gene.* **492**, 148–159 (2012).
31. Pedrini, E. *et al.* Genotype phenotype correlation study in 529 patients with multiple hereditary exostoses: identification of "protective" and "risk" factors. *J. Bone Joint Surg. Am.* **93**, 2294-302 (2011).
32. Ciavarella, M. *et al.* 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**, 339–348 (2013).
33. McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K.T. & Tufaro, F. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 668-673(2000).
34. Ropero, S. *et al.* Epigenetic loss of the familial tumor-suppressor gene exostosin-1 (EXT1) disrupts heparan sulfate synthesis in cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2753-2765 (2004).
35. Hameetman, L. *et al.* Decreased EXT expression and intracellular accumulation of heparan sulphate proteoglycan in osteochondromas and

- peripheral chondrosarcomas. *J. Pathol.* **211**, 399-409 (2007).
36. Signori, E. *et al.* A combined analytical approach reveals novel EXT1/2 gene mutations in a large cohort of Italian multiple osteochondromas patients. *Genes Chrom. Cancer* **46**, 470–477 (2007).
37. Bernard, M. A. *et al.* Diminished levels of the putative tumor suppressor proteins EXT1 and EXT2 in exostosis chondrocytes. *Cell Motil. Cytoskeleton* **48**, 149–162 (2001).
38. Hennekam, R. C. Hereditary multiple exostoses. *J. Med. Genet.* **28**, 262–266 (1991).
39. Stancheva-Ivanova, M. K. *et al.* Clinical and molecular studies of EXT1/EXT2 in Bulgaria. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 917-921 (2011).
40. Bovée J. V. EXTra hit for mouse osteochondroma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 1813–1814 (2010).
41. Hecht, J. T. *et al.* Hereditary multiple exostoses (EXT): mutational studies of familial EXT1 cases and EXT-associated malignancies. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 80–86 (1997).
42. Sarrión, P. *et al.* Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in Spanish patients with multiple osteochondromas. *Sci. Rep.* **3**, 1346 (2013).
43. Trebicz-Geffen, M. *et al.* The molecular and cellular basis of exostosis formation in hereditary multiple exostoses. *Int. J. Exp. Pathol.* **89**, 321-331 (2008).

## **Author contributions**

Study design: S.B., D.G., C.G.A. Collection and data samples: M.A.D., G.M-D., P.S., L.Z., H.H.R., F.S., Performance of experiments: M.A.D., G.M-D., C.G.A., Data interpretation and analysis: M.A.D., G.M-D., P.S., R.U., R.D-K., S.B., D.G., C.G.A. Draft composition: M.A.D., G.M-D., S.B., D.G., C.G.A. All authors reviewed the manuscript.

## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1: Clinical features and X-ray images of lesions from Latin American patients with multiple osteochondromatosis.** (A) and (B) Chondrosarcoma in the pelvis and proximal femur in patient P06; (C) humerus osteochondroma in patient P05, (D) scapular lesion in patient P41, (E) deformity of the legs in patient P28, (F) fracture in radius in patient P14, (G) curved and shortened radius and ulna in patient P30, (H) osteochondromas in metacarpals in patient P17, (I) brachymetatarsia in patient P15, (J) pedunculated osteochondroma in femur of patient P38, (K) sessile osteochondroma in patient P13, (L) radius and ulna synostoses in patient P16.

**Figure 2: Genotype–phenotype association in MO patients (n=27).** (A) Graph showing the proportion of severe phenotype (blue), mild phenotype (red) and patients with phenotype not available (green) and the distribution

of *EXT1* and *EXT2* mutations or no mutations identified (NM) within each category. (B) Grade of phenotype severity among severely affected patients and distribution of *EXT1* and *EXT2* mutations or no mutations identified (NM) within each category.

**Table 1:** Overview of *EXT1* and *EXT2* mutations and the phenotype found in this cohort

Patient	Sex	Gene	DNA	Deduced protein change	<i>EXT1</i> promoter SNP rs34016643	MLPA	Family History	Phenotype	Age of onset	Other clinical features
P01	male	<i>EXT2</i>	<b>c.1182G&gt;A</b>	p.Trp394*	Wt	NA	No	MO/IIS	1,5 y-o	Vertebral location
P02	fem	<i>EXT1</i>	c.1469delT	p.Leu490Argfs*9	Wt	NA	No	MO/IIS	5 y-o	Surgery/Sinostoses
P03	fem	ND	.....	.....	Wt	Normal	No	SO	5 y-o	Exostoses in humerus
P04	male	<i>EXT2</i>	ex 6 del	Unknown	Wt	<i>Abnormal</i>	No	MO/IIS	5 m	Shortening of limbs
P05	male	<i>EXT1</i>	c.752delT	p.Leu251*	Wt	NA	Yes	MO/IVS	4 y-o	Surgery/Axis deviations (cubito and radius)
P06 <sup>1</sup>	fem	<i>EXT1</i>	c.848T>A	p.Leu283*	Wt	Normal	Yes	MO/IVS	12 y-o	<b>Chondrosarcoma</b> /Surgery
P07	fem	ND	.....	.....	Wt	Normal	No	SO	6 y-o	Surgery
P08	fem	<i>EXT1</i>	<b>c.1037G&gt;C</b>	p.Arg346Thr	Wt	NA	No	MO/IIS	3 y-o	Scoliosis
P12	male	<i>EXT2</i>	<b>ex 4-14del</b>	Unknown	Wt	<i>Abnormal</i>	Yes	MO/IVS	2m	Surgery/Scapular and ribs location. Abnormal karyotype (18q deletion) Scapular osteochondromas
P13	male	<i>EXT2</i>	<b>c.920_929del10insTG</b>	p.Asp307Valfs*45	Wt	NA	Yes	MO/IIS	2 m	Scapular osteochondromas
P14	fem	<i>EXT1</i>	c.369_370delAG	p.Lys126Asnfs*62	Wt	Normal	Yes	MO/IS	1 y-o	Deformity of the heel
P15	male	<i>EXT1</i>	<b>c.232insG</b>	p.Val78Glyfs*111	Wt	NA	No	MO/M	8 y-o	Decreased bone density
P16	male	<i>EXT1</i>	<b>c.916A&gt;T</b>	p.Lys306*	Wt	NA	No	MO/M	4 y-o	Restricted joint motion
P17	male	<i>EXT1</i>	<b>c.791T&gt;C</b>	p.Leu264Pro	Wt	NA	Yes	MO/IIS	1 m	Ribs location
P18	male	ND	.....	.....	G/C	Normal	No	SO	14 y-o	NA
P19	male	<i>EXT2</i>	c.626+1G>A	--	Wt	Normal	Yes	MO/NA	8 y-o	Ribs location
P21	male	ND	.....	.....	G/C	Normal	No	MO/NA	9 y-o	Surgery

P24	male	ND	.....	.....	Wt	Normal	No	MO/IIS	2 y-o	Surgery/Shortening and deformities of limbs
P25	fem	<i>EXT1</i>	<b>c.1748A&gt;G</b>	p.Gln583Arg	Wt	Normal	Yes	MO/IIS	5 y-o	Vertebral location
P26	fem	ND	.....	.....	Wt	Normal	No	MO/M	11 y-o	Surgery/Scoliosis
P27	fem	<i>EXT2</i>	<b>c.1616_1623del8ins10</b>	p.Asp539Glnfs*5	Wt	Normal	No	MO/NA	2 m	Deformity of the hip
P28	male	<i>EXT1</i>	<b>c.1164 +1G&gt;A</b>	--	Wt	Normal	Yes	MO/NA	10 m	Surgery/Shortening and deformities of limbs
P29	fem	<i>EXT1</i>	c.1722+1G>A	--	Wt	Normal	No	MO/IVS	1 m	Scoliosis
P30	fem	ND	.....	.....	Wt	Normal	No	SO	4 y-o	Restricted Joint motion
P31	male	ND	.....	.....	Wt	Normal	No	SO	8 y-o	Surgery/Bilateral valgus
P32	fem	ND	.....	.....	Wt	Normal	No	SO	9 y-o	NA
P34	fem	ND	.....	.....	G/C	Normal	No	MO/IS	3 y-o	Bilateral valgus, vertebral
P36	fem	<i>EXT1</i>	ex 1del	Unknown	Wt	<i>Abnormal</i>	No	MO/M	10 y-o	NA
P37	male	<i>EXT1</i>	c.248_249insA	p.Gln84Alafs*105	Wt	NA	No	MO/NA	5 m	Dystrophy in ribs
P38 <sup>1</sup>	male	ND	.....	.....	Wt	Normal	Yes	MO/IIS	10 y-o	<b>Chondrosarcoma</b> / Severe vascular compression, phlebitis
P39	fem	ND	.....	.....	Wt	Normal	NA	MO/NA	12 y-o	Deformity of ankles
P40	male	<i>EXT1</i>	c.1018C>T	p. Arg340Cys	Wt	NA	Yes	MO/IIS	2 m	Scapular osteochondromas
P41	male	<i>EXT1</i>	c.1219C>T	p.Gln407*	G/C	NA	Yes	MO/IIS	1 y-o	Pelvic and Scapular Osteochondromas

Novel mutations are indicated in bold.

<sup>1</sup>Patients with malignant transformations to chondrosarcoma.

(Wt) wild type = G/G. (ND) No mutation detected by sequencing and MLPA analysis; (NA) Not Available; (S) Severe phenotype; (M) Mild phenotype; (MO) Multiple osteochondroma; (SO) Solitary osteochondroma.

**Table2:** List of mutations in *EXT1* or *EXT2* gene in MO patients

Gene	Patient	Exon- Intron	DNA	Deduced protein change	Mutation Type	Publication
<i>EXT1</i>	P37	Ex 1	c.248_249insA,	p.Gln84Alafs*105	Frameshift	Francannet, et al 2001
<i>EXT1</i>	P15	Ex 1	<b>c.232dupG</b>	p.Val78Glyfs*111	Frameshift	<b>This study</b>
<i>EXT1</i>	P14	Ex 1	c.369_370delAG	p.Lys126Asnfs*62	Frameshift	Ciavarella, et al, 2013
<i>EXT1</i>	P05	Ex 1	c.752delT	p.Leu251*	Nonsense	Ciavarella, et al, 2013
<i>EXT1</i>	P17	Ex 1	<b>c.791T&gt;C</b>	p.Leu264Pro	Missense	<b>This study</b>
<i>EXT1</i>	P06 <sup>1</sup>	Ex 1	c.848T>A	p.Leu283*	Nonsense	Delgado, et al, 2012
<i>EXT1</i>	P16	Ex 1	<b>c.916A&gt;T</b>	p.Lys306*	Nonsense	<b>This study</b>
<i>EXT1</i>	P36	Ex1	ex1del	Unknown	Deletion	LOVD
<i>EXT1</i>	P40	Ex 2	c.1018C>T	p.Arg340Cys	Missense	Philippe, et al, 1997
<i>EXT1</i>	P08	Ex 2	<b>c.1037G&gt;C</b>	p.Arg346Thr	Missense	<b>This study</b>
<i>EXT1</i>	P28	In 3-4	<b>c.1164+1G&gt;A</b>	--	Splice site	<b>This study</b>
<i>EXT1</i>	P41	Ex 4	c.1219C>T	p.Gln407*	Nonsense	LOVD
<i>EXT1</i>	P02	Ex 6	c.1469delT	p.Leu490Argfs*9	Frameshift	Anh, 1995
<i>EXT1</i>	P29	In 8-9	c.1722+1G>A	--	Splice site	Jennes I et al, 2008
<i>EXT1</i>	P25	Ex 9	<b>c.1748A&gt;G</b>	p.Gln583Arg		<b>This study</b>
<i>EXT2</i>	P19	In 3-4	c.626+1G>A	--	Splice site	Vink et al. 2004
<i>EXT2</i>	P13	Ex 5	<b>c.920_929del10insTG</b>	p.Asp307Valfs*45	Frameshift	<b>This study</b>
<i>EXT2</i>	P04	Ex 6	ex6del	Unknown	Deletion	Leube, et al, 2008
<i>EXT2</i>	P01	Ex 8	<b>c.1182G&gt;A</b>	p.Trp394*	Nonsense	<b>This study</b>
<i>EXT2</i>	P27	Ex 10	<b>c.1616_1623del8ins10</b>	p.Asp539Glnfs*5	Frameshift	<b>This study</b>
<i>EXT2</i>	P12	Ex 4-14	<b>ex4-14del</b>	Unknown	Deletion	<b>This study</b>

Novel mutations are indicated in bold. We considered as new mutations those not published and/or not mentioned in the LOVD databases. LOVD:<http://medgen.ua.ac.be/LOVDv.2.0/>

<sup>1</sup>Patient with malignant transformation to chondrosarcoma.



73189

U.N.R.C  
Biblioteca Central



73189