



**Universidad**  
Zaragoza

# El cilio primario y su disfunción en el desarrollo de las osteochondrodisplasias.

Primary cilia and its dysfunction in  
osteochondrodysplasia.

Autor:

PAULA CASTILLO AGUIRRE

Directores:

TOMÁS CASTIELLA MURUZÁBAL

M<sup>a</sup> JOSÉ CARDIEL GARCÍA

PATRICIA SOTA OCHOA

Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza.

Curso académico 2016-2017

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>5</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>6</b>
<b>1. . CILIOS.</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Tipos de cilios.</b>	<b>6</b>
<b>2. CILIOS 9+0: CILIO NODAL Y CILIO PRIMARIO</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Estructura.</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Transporte intraflagelar.</b>	<b>10</b>
<b>2.3. Funciones del cilio primario.</b>	<b>12</b>
<b>2.4. Ciliogénesis.</b>	<b>13</b>
<b>2.5. Vías de señalización del cilio primario.</b>	<b>15</b>
<b>3. CILIOPATÍAS</b>	<b>18</b>
<b>4. DESARROLLO DEL HUESO</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Papel de Ihh y otras vías de señalización en la osificación</b>	<b>22</b>
<b>5. CILIO PRIMARIO COMO SENSOR EXTRACELULAR EN EL HUESO</b>	<b>24</b>
<b>6. CILIO PRIMARIO Y OSTEOCONDRODISPLASIAS</b>	<b>26</b>
<b>6.1. Síndromes de Costillas cortas</b>	<b>28</b>
<b>6.1.1 Síndrome Verma-Namouff</b>	<b>28</b>
<b>6.1.2. Displasia Torácica Asfixiante de Jeune</b>	<b>30</b>
<b>6.1.3. Síndrome de Ellis Van Creveld</b>	<b>31</b>
<b>6.1.4. Síndrome Orofaciodigital tipo 1</b>	<b>33</b>
<b>6.2. Exostosis Múltiple Hereditaria</b>	<b>34</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>36</b>

## RESUMEN

El cilio primario es un orgánulo celular que durante muchos años fue considerado como una estructura vestigial sin función relevante, y que en la última década ha suscitado un gran interés gracias a las recientes investigaciones que revelan su importante papel sensorial para detectar señales químicas, mecánicas y luminosas. El cilio primario es una organela microtubular que emerge de la superficie celular y que contribuye al desarrollo y función de la mayor parte de los órganos del cuerpo humano.

El cilio primario es un cilio único e inmóvil, formado por un axonema de nueve dobletes de microtúbulos con estructura 9+0, y que se origina a partir de un centriolo que constituye el cuerpo basal del cilio. Se encuentra en la mayoría de las células del organismo de los mamíferos y en él se localizan receptores y proteínas de distintas vías de señalización, y de forma específica de las vías Hedgehog y Wnt/ $\beta$  catenina de crucial importancia en el desarrollo embrionario y homeostasis de numerosos órganos.

La importancia del cilio primario ha sido puesta de manifiesto en gran parte por el descubrimiento de que múltiples, a menudo graves, enfermedades hereditarias, se deben a defectos en los genes que codifican proteínas ciliares. La disfunción ciliar provoca un amplio espectro de enfermedades conocidas como ciliopatías, en las que se producen alteraciones sindrómicas con disfunción de múltiples órganos del individuo. Las investigaciones llevadas a cabo han podido identificar los genes involucrados en estas ciliopatías.

En los últimos años, se ha investigado el papel del cilio primario en el desarrollo y homeostasis del esqueleto. En este trabajo de revisión bibliográfica se muestran los avances alcanzados en este campo así como la relación directa del cilio primario con algunas osteocondrodisplasias. Entre ellas las osteocondrodisplasias de costillas cortas y polidactilia tipo Síndrome de Verma-Namouff, Displasia torácica asfixiante de Jeune, Síndrome de Ellis van Creveld y Síndrome orofaciodigital tipo 1, así como en la osteocondromatosis múltiple hereditaria.

Aunque la complejidad de estas relaciones ha sido definida en parte, todavía quedan muchas cuestiones que resolver para que el cilio primario pueda ser considerado como una diana terapéutica.

**Palabras clave:** cilio primario, ciliopatías, osteocondrodisplasias, osteocondroma, síndrome de Verma-Namouff, Displasia torácica asfixiante de Jeune. Síndrome de Ellis van Creveld, Síndrome orofaciodigital tipo 1.

## ABSTRACT

Primary cilium is a cell organelle which for many years was considered a vestigial structure without major role, and that in the last decade has attracted great interest thanks to recent research that reveal his role sensory to detect chemical, mechanical and light signals. The primary cilium is a microtubule organelle which emerges from the cell surface, and contributes to the development and function of most of the organs of the human body.

The primary cilium is a unique and still, cilium consisting of an axoneme of nine doublets of microtubules with structure 9+0, and which originates from a centriole which constitutes the cilium basal body. Found in most of the cells of mammals, the receptors and proteins of different ways of signaling, are located in cilia, including ones of the Hedgehog and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways which are crucial in embryonic development and homeostasis of many organs.

The importance of the primary cilium has been put of manifest to a large extent by the discovery that multiple, often severe, hereditary diseases, are due to defects in genes that encode proteins of ciliary. Ciliary dysfunction causes a wide spectrum of diseases known as ciliopathies, which are produced syndromic alterations with dysfunction of multiple organs of the individual. Investigations carried out have been able to identify the genes involved in these ciliopathies.

In recent years, the role of the primary cilium in the development and homeostasis of the skeleton has been investigated. This work of literature review shows the progress made in this field as well as the relationship direct ta of the primary cilium with some osteochondrodysplasias. Between them the osteochondrodysplasias of short ribs and polydactyly type syndrome of Verma - Namouff, Asphyxiating thoracic dysplasia of Jeune, Ellis van Creveld syndrome and orofaciodigital syndrome type 1, as well as the multiple hereditary osteochondromatosis.

Although the complexity of these relations has been defined in part, there are still many issues to resolve so that the primary cilium can be considered as a therapeutic target.

**Key Words:** primary cilium, ciliopatías, osteochondrodysplasias, osteochondroma, Verma-Namouff, Jeune asphyxiating thoracic dysplasia syndrome. Ellis van Creveld syndrome, syndrome orofaciodigital type 1

## INTRODUCCIÓN

El cilio primario es una organela presente en la mayoría de las células eucariotas, identificada hace varias décadas y considerada un órgano vestigial. Al contrario de lo que ocurre con los cilios móviles, el cilio primario es escasamente conocido.

En los últimos diez años, la comunidad científica ha realizado numerosos estudios sobre esta organela, la cual es considerada un tipo de antena localizado en la superficie de la mayoría de células de mamíferos, la cual es capaz de detectar estímulos lumínicos, químicos y mecánicos y cuyo correcto funcionamiento tiene un papel vital en el desarrollo y homeostasis celular <sup>1</sup>.

El detonante para que el número de investigaciones sobre el cilio primario haya aumentado exponencialmente es debido a la identificación de los genes involucrados en distintas enfermedades hereditarias monogénicas los cuales codifican proteínas del cilio primario. Las enfermedades en las que el cilio primario se ha visto involucrado tienen lugar tanto en la embriogénesis como en la vida adulta. Algunas de ellas son la poliquistosis renal y la hepática.

De esta manera, las proteínas anómalas identificadas se pueden localizar en sitios específicos del cilio, constituyendo su estructura o como receptores de membrana ciliar. Estos receptores son fundamentales en las vías de señalización Wnt, HH, PDGFRa, FGFR, NFKappaB, imprescindibles en el desarrollo y la homeostasis <sup>1</sup>.

Las distintas disfunciones ciliares producen un amplio espectro de enfermedades conocidas como ciliopatías, muchas de las cuales presentan alteraciones en el desarrollo esquelético, sugiriendo el papel indispensable en el desarrollo del hueso.

Algunas de las mutaciones identificadas en las osteocondrodisplasias, codifican proteínas anormales del cilio en sí mismo o de su matriz, pudiendo alterar las vías de regulación y desarrollo del hueso como Hedgehog (HH), Wnt/ $\beta$ catenina, entre otros.

El fin de este trabajo consiste en una revisión de la bibliografía existente sobre el papel del cilio primario en la formación del hueso y su correcta función así como de su alteración asociada la aparición de osteocondrodisplasias. Hemos encontrado la implicación directa o indirecta del cilio primario en el grupo de osteocondrodisplasias de costillas cortas con o sin polidactilia, así como de la exostosis múltiple hereditaria.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

En este trabajo, se ha realizado una revisión sistemática de varios artículos científicos en la base de datos de PubMed.

En primer lugar, utilicé la palabra clave primary cilia, acotando los distintos artículos a los últimos 5 años, a la especie humana, y a texto gratuito completo, consiguiendo así un total de 434 artículos. Para acotar más la búsqueda, añadí nuevas palabras clave como primary cilia ciliogénesis, primary cilia functions, entre otros.

Posteriormente, utilicé las palabras clave ciliopathies primary cilium con el fin de encontrar información acerca de las ciliopatías. El resultado, acotado a 5 años y a la especie humana es de 269 artículos.

Se han incluido, artículos en inglés y en español. Para su selección, se revisaron los abstracts y la introducción, escogiendo los más relevantes, los cuales se estudiaron en su totalidad. Además me serví de la bibliografía de los más importantes para buscar nueva bibliografía de los campos de mayor relevancia para el trabajo.

Por último, mi tutor me ha proporcionado varios artículos así como me ha permitido la consulta del libro “Molecular biology of the cell” (Alberts B, et al., 4ª ed, 2012)

## RESULTADOS

### 1. CILIOS.

Los cilios son organelas piliformes de las células eucariotas, pudiendo ser estos móviles o no, así como únicos o múltiples y desempeñar distintas funciones: **motoras** como el barrido que realizan sobre el epitelio respiratorio proporcionando protección frente a gérmenes y **sensoriales** como en ciertos epitelios olfatorios o en las células ciliadas del oído interno donde son responsables del equilibrio.

El campo de los cilios es un área de estudio con una larga historia. Originalmente, los cilios fueron definidos por su motilidad y se creyó que esta era su única función. En la segunda mitad del siglo XIX, Zimmermann observó otra clase de cilios en células de mamíferos. Se trató de un cilio único e inmóvil que nombró como flagelo central, el cual no recibió mucha atención. Será a inicios del siglo XXI, con los avances tecnológicos en diagnóstico celular y microscopía cuando crecerá el interés por el cilio primario, debido a su función sensorial y su importancia clínica.

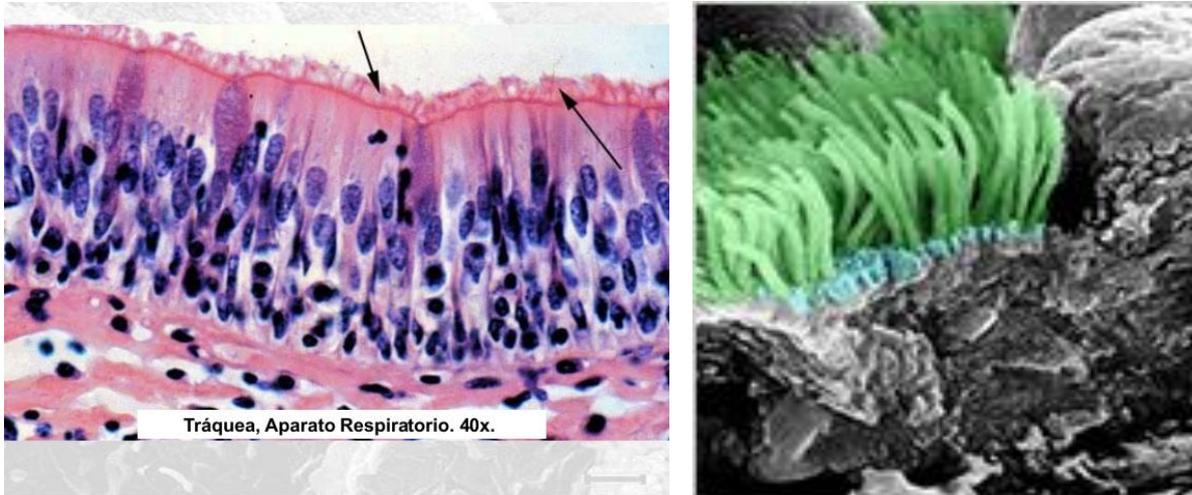
#### 1.1. TIPOS DE CILIOS.

En la actualidad podemos distinguir entre tres tipos de cilios atendiendo a su capacidad para moverse así como el tipo de movimiento.

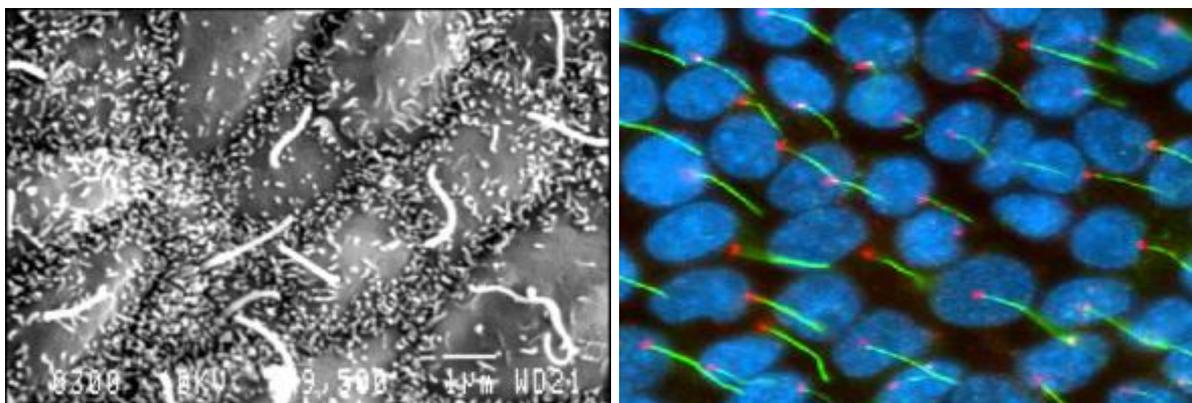
La primera categoría de cilio son los **cilios móviles** localizados fundamentalmente en el sistema respiratorio, sistema reproductor femenino, o en el epitelio endodermio, con movimientos unidireccionales.

En segundo lugar, el **cilio nodal** que se encuentra ubicado en las células que forman el nodo embrionario (parte posterior de la notocorda), realiza movimientos rotacionales ocupando un importante papel durante la embriogénesis asegurando la correcta simetría lateral en los diferentes órganos corporales. Este movimiento de rotación genera un flujo detectado por los receptores del lado izquierdo del cuerpo, los cuales a su vez inician mecanismos de señalización que difieren de los del lado derecho del embrión. Si este flujo nodal no se produce, se origina una disposición incorrecta de las vísceras, ocasionando el denominado Situs inversus o “imagen en espejo”<sup>2</sup>.

La última categoría es el **cilio primario**, inmóvil y presente en numerosas células del organismo el cual, desempeña numerosas funciones de señalización celular con el fin de conseguir el correcto desarrollo y homeostasis de los distintos tejidos del organismo <sup>1</sup>.



1 y 2. Cilios móviles del epitelio respiratorio vistos en microscopio óptico (1) y en microscopio electrónico de barrido (2) <sup>3</sup>.



3. Cilio nodal visto en microscopio electrónico de barrido <sup>4</sup> 4. Cilio primario visto con técnicas de inmunofluorescencia (rojo: anticuerpo antipericentrilina, verde: anticuerpo antitubulina) <sup>5</sup>.

## 2. CILIOS 9+0: CILIO NODAL Y CILIO PRIMARIO.

### 2.1. ESTRUCTURA.

La mayoría de los cilios del organismo presentan una estructura 9+2, es decir su axonema consta de 9 pares de microtúbulos periféricos y de un par de microtúbulos centrales. Sin embargo, en las células eucariotas existen cilios de estructura 9+0, en los que falta el par de microtúbulos centrales <sup>1</sup>. En un principio se consideraron vestigios de los 9+2 pero

actualmente se conoce que presentan funciones de gran importancia. Éstos son el cilio primario y el cilio nodal <sup>1</sup>.

En la estructura de los cilios se ven implicadas un gran número de proteínas. Así, el núcleo de la estructura ciliar, **el axonema**, está formado por 9 pares de microtúbulos (denominados microtúbulo A y microtúbulo B) y éstos a su vez están constituidos por protofilamentos (el A posee 13 mientras que el B 10, compartiendo 3 con el A). Estos protofilamentos están constituidos por hileras de dímeros de tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$  <sup>1</sup>.

En los cilios 9+2, presentan brazos de dineína unidos a los dobletes de microtúbulos. Estas dineínas son unas proteínas que mediante la hidrólisis de ATP permiten el desplazamiento de unos dobletes de microtúbulos, consiguiendo el movimiento ciliar <sup>1</sup>.

En el axonema del cilio primario existen múltiples moléculas solubles que se verán implicadas en vías de señalización celular.

Los microtúbulos del axonema emergen de un centriolo (9 tripletes de microtúbulos) situado en el citoplasma, formando la zona del cilio denominada **cuerpo basal**, el cual permanece en contacto con el citoesqueleto citoplásmico a través de los radios ciliares <sup>6</sup>.

De esta forma a pesar de que el cilio primario y el cilio nodal son cilios únicos y comparten una estructura 9+0, el cilio nodal posee al igual que los cilios móviles 9+2, brazos de dineína los cuales le permiten realizar un movimiento de rotación que será fundamental para crear el flujo que permite la correcta disposición de los órganos durante la embriogénesis. Por el contrario el cilio primario no posee brazos de dineína, tratándose de este modo de un **cilio inmóvil** <sup>1</sup>.

Toda la estructura ciliar está rodeada de **membrana ciliar** la cual, en el cilio primario, cuenta con numerosos canales y proteínas receptoras que la dotan de una alta especialización. Por último, entre el cuerpo basal y el axonema existe una zona delimitada del citoplasma que funciona como barrera selectiva para el tráfico de proteínas llamada **zona de transición** <sup>1</sup>.

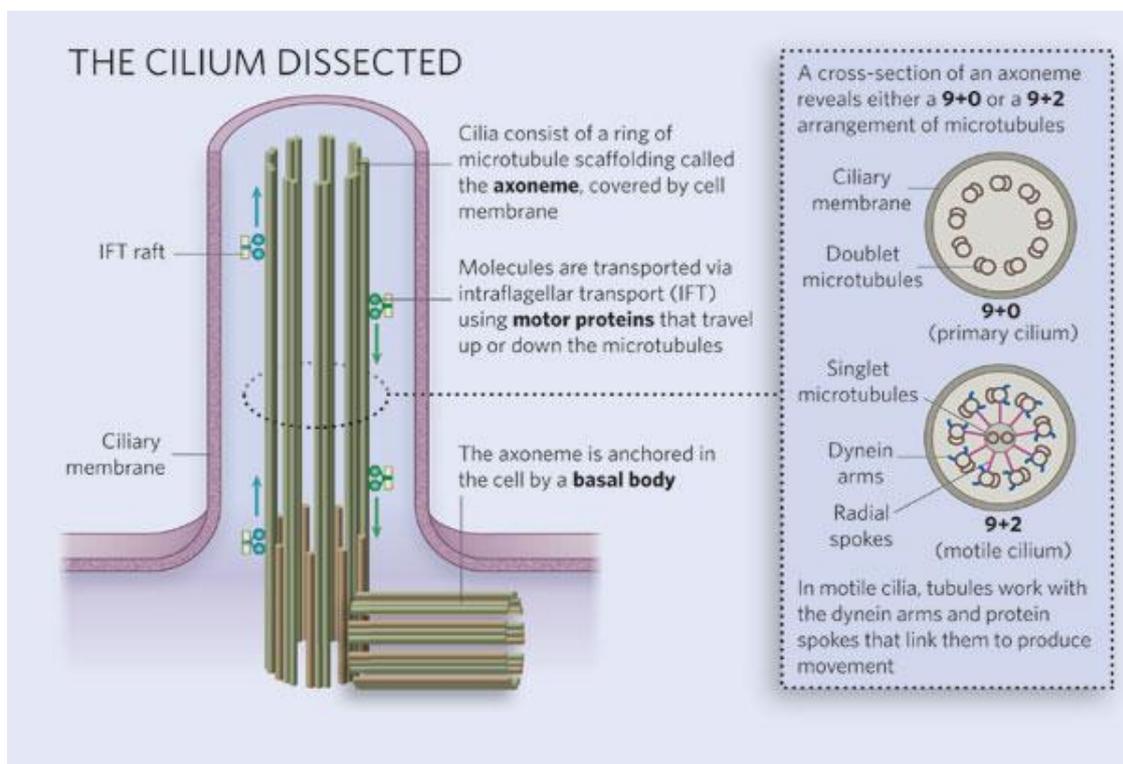
En cada ciclo celular, el cilio primario aparece al comienzo de G1 y se origina a partir de centriolos preexistentes, de los cuales, el denominado centriolo madre se transformará en el cuerpo basal del cilio primario <sup>1</sup>.

El crecimiento del axonema se lleva a cabo mediante un proceso de transporte intraflagelar (IFT) y este determina la longitud final del cilio (de unos pocos  $\mu\text{m}$  hasta 100  $\mu\text{m}$ ) <sup>6</sup>. Este

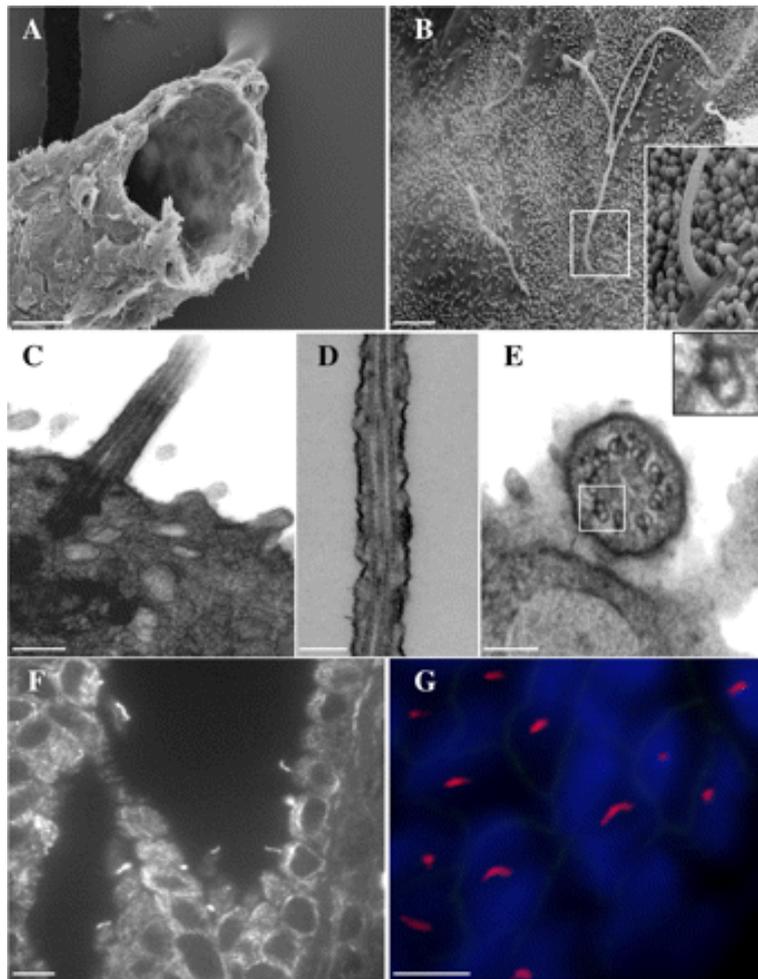
transporte, también estará implicado en la función sensorial del cilio y se explicará más adelante.

El cilio nodal, desempeña su papel en la embriogénesis asegurándose la correcta lateralidad del cuerpo. De esta forma son cilios móviles que mediante su rotación a través de microtúbulos de dineína originan la asimetría derecha-izquierda de nuestros órganos. Este flujo nodal se transmite en el sentido de las agujas del reloj de manera que los receptores del lado izquierdo inician diferentes vías de señalización a los del lado derecho. De este modo, si no se produce este flujo nodal, se produce la conocida condición de Situs Inversus, en las que las vísceras del organismo se disponen de forma anómala presentando una simetría en espejo respecto al plano sagital. Esta condición puede ser total, afectando a todas las vísceras del organismo o limitada a determinados órganos como por ejemplo la dextrocardia, en la que el corazón está orientado hacia la derecha<sup>2</sup>.

El cilio primario es el principal objeto de nuestro trabajo, se encarga de transducir múltiples señales, actuando como una antena fundamental para la célula como veremos a continuación. Es único por cada célula e inmóvil, midiendo de 2-5  $\mu\text{m}$  de longitud y 200-300 nm de ancho por lo que no se ven a microscopio óptico con técnicas convencionales por lo que para su observación se emplean técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos frente a tubulina y/o pericentrina o microscopía electrónica de transmisión o de barrido.



5. Estructura ciliar: diferencias entre el cilio móvil y el cilio primario<sup>1</sup>.



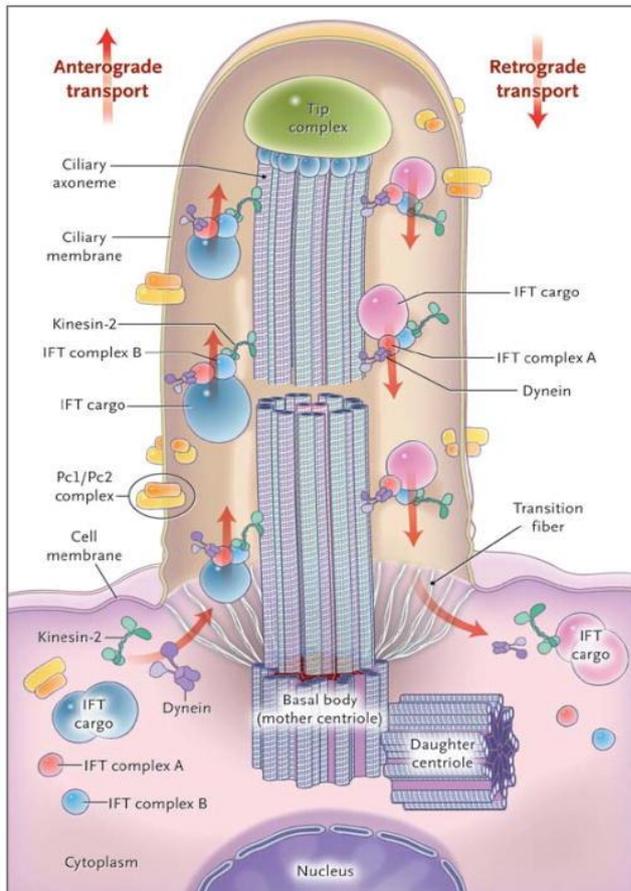
**6.A:** imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de un conducto biliar intrahepático microdisecionado. **B:** cilios primarios de colangiocitos. Imágenes microscópicas electrónicas de transmisión (TEM) de secciones longitudinales (C y D) y secciones transversales (E) de cilios de colangiocitos con estructura 9+0 . La microscopía inmunofluorescente de transmisión (F) y confocal (G) de una sección transversal de un conducto biliar (F) aislado y un montaje completo de un conducto biliar (G) teñido con la  $\alpha$ -tubulina <sup>7</sup>.

## 2.2. TRANSPORTE INTRAFLAGELAR.

El cilio primario es una estructura inmóvil pero cuyo axonema se encuentra en una situación de inestabilidad dinámica. Este concepto indica que la longitud del cilio permanece estable gracias a que en el extremo distal (+) se produce polimerización de los monómeros de dineína y tubulina, mientras que en el distal (-) se despolimerizan. De este modo, si la velocidad de polimerización supera a la de destrucción, la longitud del cilio aumenta <sup>6</sup>.

Además, este mecanismo de transporte intraflagelar (IFT), no sólo está implicado en aportar proteínas estructurales al cilio, sino también en aportar proteínas relacionadas con la señalización celular y el control de la división celular <sup>6</sup>.

El IFT consiste en un transporte bidireccional de moléculas (carga) a lo largo del axonema, llevado a cabo por un complejo proteico IFT, siendo las proteínas motoras que circulan hacia el extremo distal del cilio las quinesinas y las que circulan hacia la base del cilio las dineínas. Este complejo IFT, también denominado Raft, está formado por las unidades IFTA e IFTB. <sup>8</sup>.



En primer lugar, se produce el ensamblaje de los componentes IFT en la base del cilio. El transporte anterógrado se inicia con la activación de la quinesina 2 que acopla su carga a la dineína 1b inactivada. La quinesina OSM-3 realiza el transporte en la parte distal. Al llegar al ápice, se inactivan las proteínas motoras anterógradas, se desensamblan y descargan las partículas IFT. El transporte retrógrado comienza con la activación de la dineína 1b y la acoplación de su carga y la inactivación de la quinesina responsable del transporte anterógrado.

### 7. Estructura y transporte intraflagelar del cilio primario <sup>9</sup>.

Existen numerosos genes implicados en la formación de este complejo IFT, de forma que la mutación de uno de éstos puede dar lugar a una disfunción del cilio y con ello a numerosas enfermedades catalogadas como ciliopatías entre las que se encuentran la Poliquistosis Renal o la Poliquistosis Hepática, algunos tipos de cáncer, o enfermedades del desarrollo esquelético.



8.9. Riñón con poliquistosis renal autosómica dominante (8) y visto en microscopio óptico (9)<sup>10</sup>

### 2.3. FUNCIONES GENERALES DEL CILIO PRIMARIO

El cilio primario presenta una amplia variedad de funciones dada su existencia en la mayoría de células del organismo. La función del cilio primario como regulador homeostático y del desarrollo está clara, ya que se le considera una antena sensorial capaz de detectar estímulos extracelulares y transducirlos al medio intracelular. Por ello, a día de hoy existen numerosas líneas de estudio investigando la posible relación del cilio primario con determinadas enfermedades.

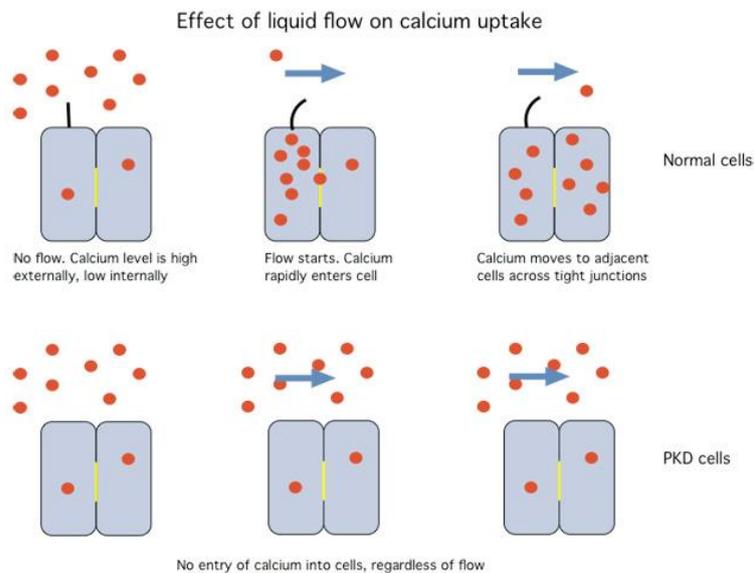
El cilio primario, es capaz de detectar estímulos lumínicos, químicos, mecánicos y térmicos. Las funciones del cilio primario son muy diversas. Una de ellas es la regulación de los niveles de calcio intracelulares. Así el examen de células del túbulo renal mostró como los cilios primarios cambian su curvatura al exponerse al líquido en movimiento, para iniciar una rápida absorción de calcio<sup>1</sup>. La Poliquistosis renal podría deberse a alteraciones en este mecanismo ciliar.

Las estructuras del cilio primario realizan distintas funciones. Por ejemplo, el cuerpo basal y la zona de transición regulan el paso selectivo de moléculas específicas al interior ciliar gracias a distintas proteínas y canales iónicos. Además participan en la ciliogénesis. El complejo de proteínas del transporte IFT realiza numerosas funciones diferentes al igual que la matriz y membrana ciliar, compuestas por múltiples proteínas que les permiten al cilio actuar como un receptor sensorial y transducir numerosas señales al interior celular<sup>6</sup>.

El cilio primario puede modular las respuestas celulares y tisulares en dependencia de las señalizaciones que reciba. De este modo, el cilio presenta numerosos receptores en su membrana para hormonas específicas como la somatostatina, factores de crecimiento o morfogenes como Sonic hedgehog (Shh) y Wnt que desempeñan papeles esenciales en la fase embrionaria y en el desarrollo a lo largo de la vida<sup>12</sup>.

Además el cilio desempeña un papel importante en la proliferación, migración y supervivencia celular. Se conoce que el cilio primario puede inducir la diferenciación de células madre en distintos tejidos: nervioso, adiposo, óseo, etc. Un ejemplo es la diferenciación de las células madre en astrocitos<sup>13</sup>. El cilio primario de los astrocitos de la zona subventricular actúa como sensor del líquido cefalorraquídeo y es capaz de responder a distintos estímulos como la concentración osmótica, pH, factores de crecimiento y neurotransmisores. En el año 2010, se descubre la participación del cilio en la migración de interneuronas del cortex, considerando así que podía verse implicado en la memoria y el aprendizaje<sup>13</sup>.

En conclusión, el cilio primario es una organela con múltiples funciones, las cuales se basan en la formación y desarrollo de los tejidos así como en conseguir la homeostasis en los mismos y su correcto funcionamiento.



**10.** El efecto del flujo del fluido en la captación de calcio en las células normales y en la Poliquistosis renal dominante (PKD).<sup>12</sup>

#### 2.4. CILIOGÉNESIS.

La ciliogénesis consiste en el proceso de desarrollo de los centriolos y su maduración la cual da lugar a los cilios. De este modo, el axonema se desarrolla del centriolo madre o distal que da lugar al cuerpo basal. El centriolo proximal, está unido al distal y próximo al aparato de Golgi.<sup>12</sup>

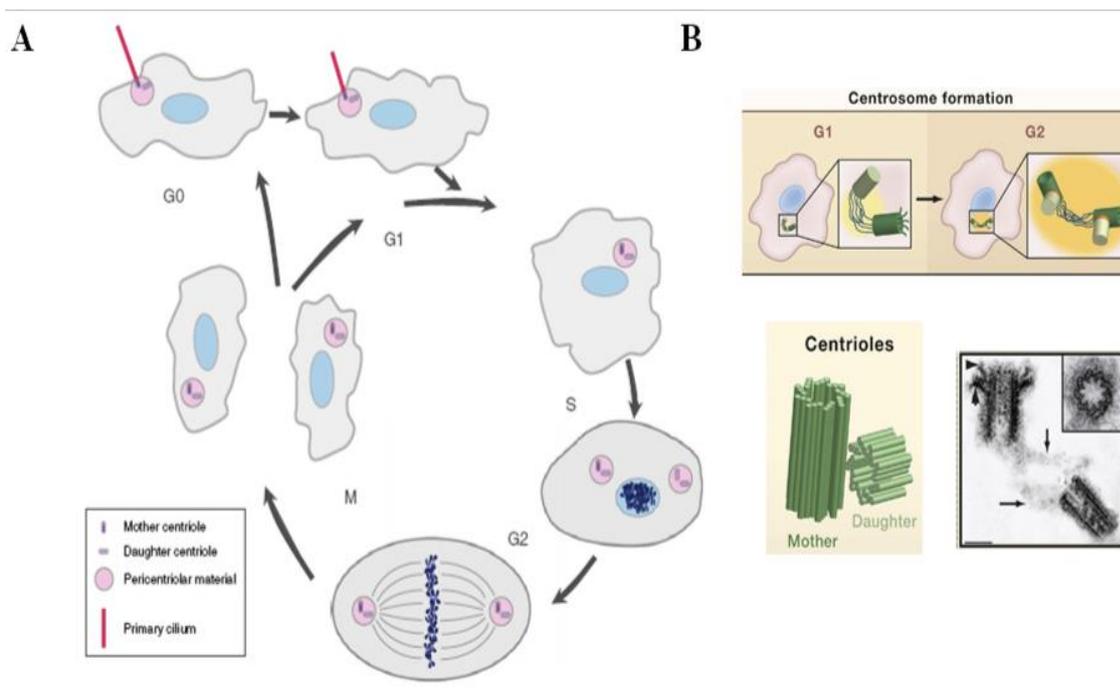
Los centriolos, son los encargados de la formación del huso mitótico además de actuar como cuerpo basal de los cilios. Se considera que los cilios son estructuras postmitóticas que sólo están presentes en células quiescentes<sup>12</sup>.

El ciclo celular está altamente coordinado con la ciliogénesis. En la fase G los centriolos forman la matriz pericentriolar (PCM) que origina el centrosoma y éste al centro organizador de microtúbulos (MTOC) a partir del cual comienzan a polimerizarse los microtúbulos citoplasmáticos que constituyen parte del citoesqueleto celular. En la fase S, se duplica el centrosoma y se originan los centriolos hijos, que funcionarán como centriolos parenterales en la fase M. En G2 se acumulan más PCM para organizar a los microtúbulos durante la mitosis.<sup>12</sup>

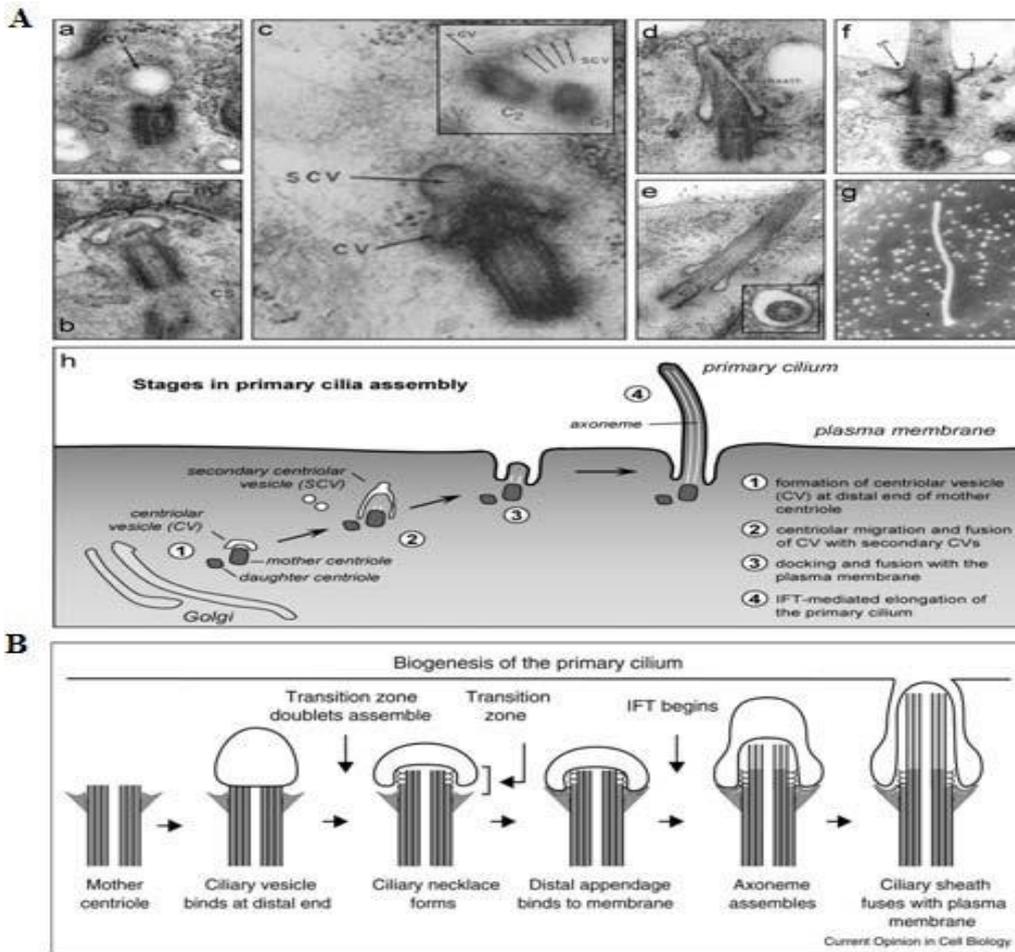
En G2/M, la diferencia de los centriolos padres con los centriolos hijos es la presencia de apéndices distales y subdistales, necesarios para la migración y el anclaje del centriolo madre a

la membrana. Si no se formarían los apéndices, la ciliogénesis se inhibiría. Posteriormente, tiene lugar la polimerización del axonema, en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.<sup>12</sup>

Durante la década de los 60, Sorokin estudió la ciliogénesis en células musculares. En primer lugar, una vesícula derivada del aparato de Golgi (vesícula centriolar) se une al centriolo madre, desde el cual emergerá el axonema. A medida que el centriolo se mueve, la vesícula comienza a invaginarse y el centriolo forma las estructuras accesorias para convertirse en el centriolo distal. En una segunda etapa tiene lugar una fusión de nuevas vesículas (vesículas centriolares secundarias) que formarán una vaina y envolverán el axonema que comienza a elongarse hacia el medio extracelular. El proceso finaliza cuando la membrana que rodea al axonema alcanza la superficie celular y se fusiona con ella, creando unas “hebras” de partículas intramembrana en comunicación con el centriolo madre.<sup>12</sup>



**11. Ciliogénesis.** A. El cilio se forma en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, tras el anclaje del centriolo madre en la membrana plasmática . B. Formación del centrosoma y acumulación del material pericentriolar en G<sub>2</sub>. M.E de apéndices distales y subdistales del centriolo madre.<sup>20</sup>



12. A. Estadios de formación del cilio primario. CV, vesícula centriolar. SCV, vesícula centriolar secundaria. B. Esquema resumen de las fases de formación del cilio primario.<sup>12</sup>

## 2.5. VIAS DE SEÑALIZACIÓN EN EL CILIO PRIMARIO.

A lo largo de los años, se han identificado una serie de vías de señalización del cilio primario las cuales juegan un papel determinante en el control celular. En el cilio primario son de máxima importancia las vías Wnt, y la vía Hedgehog.

### 2.5.1. VÍA PROTEÍNAS WNT Y RECEPTORES FRIZZLED, INHIBICIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE $\beta$ -CATENINA.

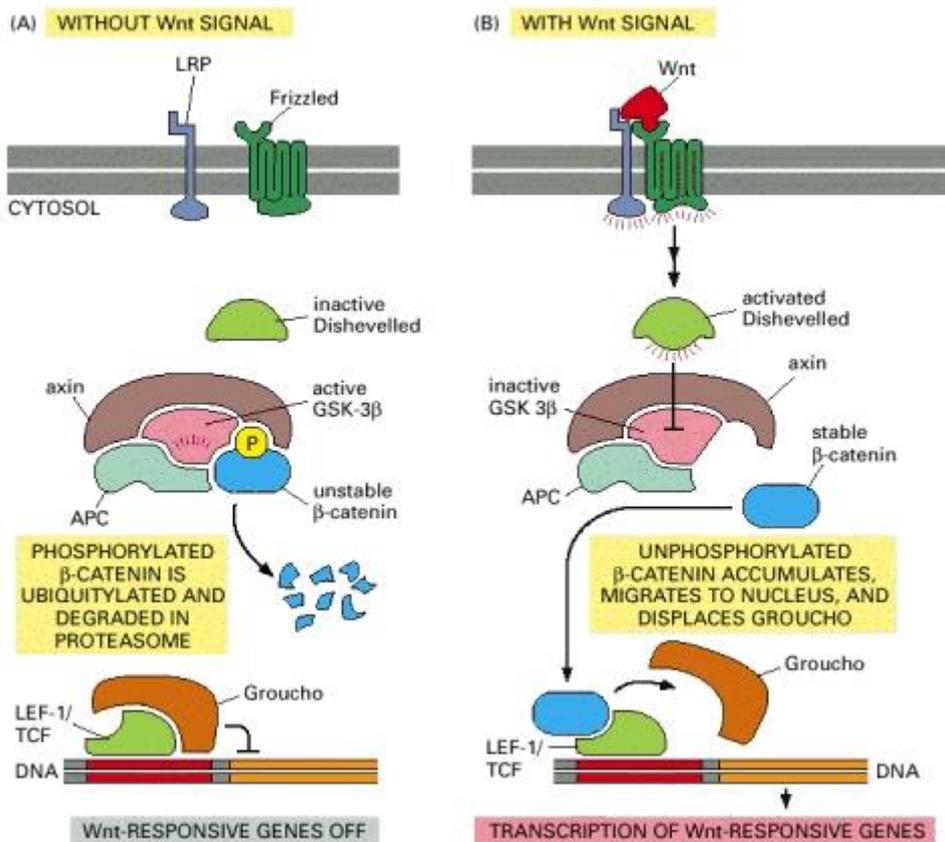
La  $\beta$ -catenina es una proteína citosólica y nuclear que se encarga tanto de la adhesión celular (ancla cadherinas al citoesqueleto de actina), así como de la regulación transcripcional en la embriogénesis.

Cuando la  $\beta$ -catenina no se asocia a cadherinas, un complejo proteico la degrada en el citoplasma. Este complejo está formado cuatro proteínas: caseína quinasa 1 (CKA1), glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK3), proteína APC (poliposis adenomatosa coli) y axina. La CKA1,

fosforila la  $\beta$ -catenina en una serina y la marca de modo que GSK3, la fosforile y sea degradada por los proteosomas. La axina y la APC actúan uniendo el complejo proteico.<sup>15</sup>

En la vía Wnt/ $\beta$ catenina, Wnt se une tanto a la proteína Frizzled como a la proteína receptora relacionada con el receptor de LDL (LRP:LDL). Al formarse este complejo, ambas quinasas, la GSK3 y CK1 $\gamma$ , fosforilan la cola citosólica del receptor LRP, que inactiva la axina, y desmonta la degradación. Así, se inhibe la fosforilación y la degradación de la  $\beta$ -catenina, y por lo tanto la  $\beta$ -catenina no fosforilada se acumula gradualmente, trasladándose hacia al núcleo. Una vez en el núcleo, se une a proteínas activadoras de la familia TCF/LEF, encargados de la transcripción de genes Wnt necesarios para el desarrollo embrionario.<sup>15</sup>

El complejo formado por la cadherina y  $\beta$ -catenina tiene una participación importante en el desarrollo normal del organismo (regula la proilferación celular, polaridad y destino de las células) y en la aparición de enfermedades como tumores, como es el caso de la Poliposis adenomatosa familiar.<sup>15</sup>



13. Esquema de la vía Wnt/ $\beta$ catenina. A: ausencia de señal Wnt. B: Wnt unido a Frizzled.<sup>15</sup>

### 2.5.2. VÍA HEDGEHOG.

La vía de señalización de Hedgehog (Hh) juega un papel importante en la regulación de la diferenciación celular y la formación de órganos durante el desarrollo embrionario normal de los vertebrados, asegurando que los tejidos en desarrollo alcanzan su correcto tamaño, localización y contenido celular.<sup>15</sup>

La vía de Hh se inactiva en la mayoría de los tejidos adultos, con la excepción de las funciones de mantenimiento y reparación de tejidos.<sup>15</sup>

Es importante destacar que su reactivación inapropiada en los tejidos adultos se ha relacionado con el desarrollo de varios cánceres humanos, en particular carcinoma basocelular (CBC) y algunos meduloblastomas.<sup>15</sup>

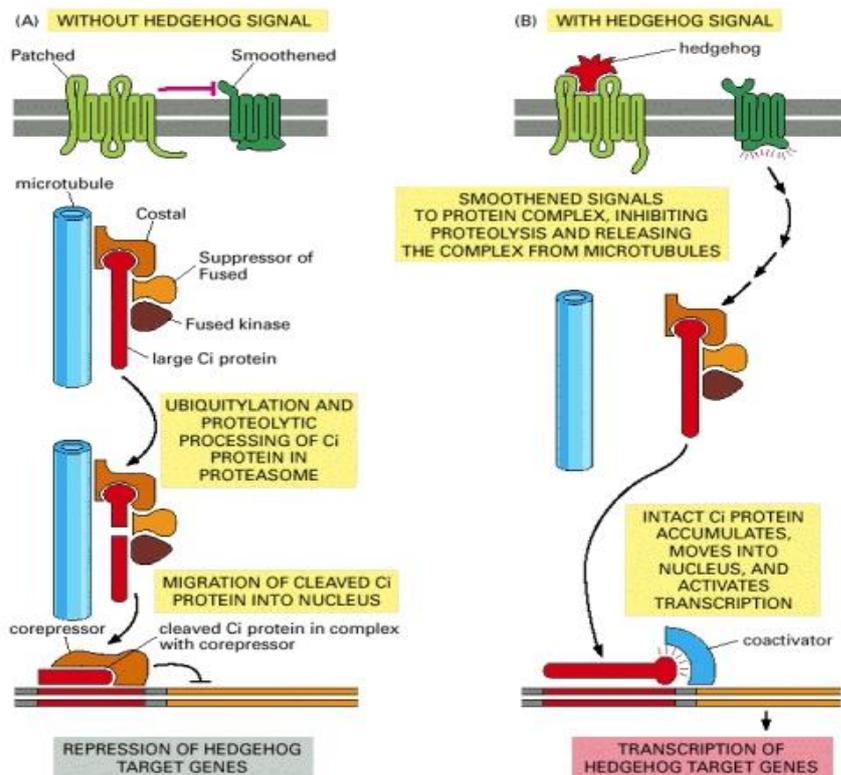
Por tanto, la vía de señalización de Hh representa una potencial diana terapéutica para los nuevos tratamientos antineoplásicos.

La vía de señalización Hedgehog (Hh), normalmente se encuentra inactivada, por la ausencia del ligando Hh, un péptido secretado por células del entorno. Los distintos tipos de ligando Hh son: Sonic Hh (Shh), Indian Hh (Ihh) y Desert Hh (Dhh). En la membrana del cilio primario existen receptores de esta molécula ligando. El inicio de esta vía comienza con la unión del ligando Hh a su receptor Patched (PTC). Si por el contrario, no se produce la unión ligando – receptor, PTC bloquea Smoothed (SMO). SMO es una proteína G que actúa como transductor de señales al interior de la célula. SMO puede estar secuestrado en una vesícula o insertado en la membrana plasmática. Si SMO está bloqueado por PTC, no se envían señales al interior de la célula.<sup>15</sup>

La vía Hedgehog se inicia cuando el ligando Hh se une a PTC, eliminando su efecto inhibitorio sobre SMO. SMO que se encontraba en el interior de una vesícula, es fosforilado, llega a la superficie celular y se produce su translocación al cilio primario. SMO se desbloquea e inicia la cascada intracelular.<sup>15</sup>

SMO estimulará la adenilato ciclasa, aumentando el AMP-c, que activará a su vez a PKA. Llegados a este punto la PKA actúa activando a su vez los factores de transcripción Gli. Los factores de transcripción Gli más frecuentemente involucrados en esta vía de señalización celular son Gli1, Gli2 y Gli3. La proteína Supresor of Fused (SUFU) participa en el proceso de formación de las formas activadoras e inhibitoras de los factores Gli, en dependencia de la presencia o ausencia de Hh en la vía de señalización. Estos factores Gli en su forma activada se

adentran en el núcleo celular y permiten la expresión de genes diana Hh que favorecen la proliferación y diferenciación celular.<sup>15</sup>



14. Esquema de la vía Hedgehog. A: en ausencia de Hedgehog. B: Hedgehog unido a Patched.<sup>15</sup>

### 3. CILIOPATÍAS.

Las ciliopatías comprenden un grupo de trastornos asociados con mutaciones genéticas que codifican proteínas defectuosas que causan la disfunción del cilio. Dado que los cilios están presentes en la mayoría de las células de vertebrados, las manifestaciones de las ciliopatías son múltiples, de forma que no afectan a un único órgano sino que la alteración se produce en numerosos aparatos y sistemas del organismo.<sup>16</sup>

Algunas ciliopatías conocidas son la **enfermedad poliquística renal, la nefronoptosis, la retinosis pigmentaria, el síndrome Bardet Biedl y el síndrome Joubert**, aunque se conocen muchas más.<sup>16</sup>

Algunas características comunes de las ciliopatías son la degeneración retiniana, la enfermedad renal, hepática e incluso diabetes y obesidad. Así mismo en ellas aparecen problemas en el desarrollo esquelético, ocasionando osteocondrodisplasias, en las cuales nos centraremos en este trabajo.<sup>17</sup>

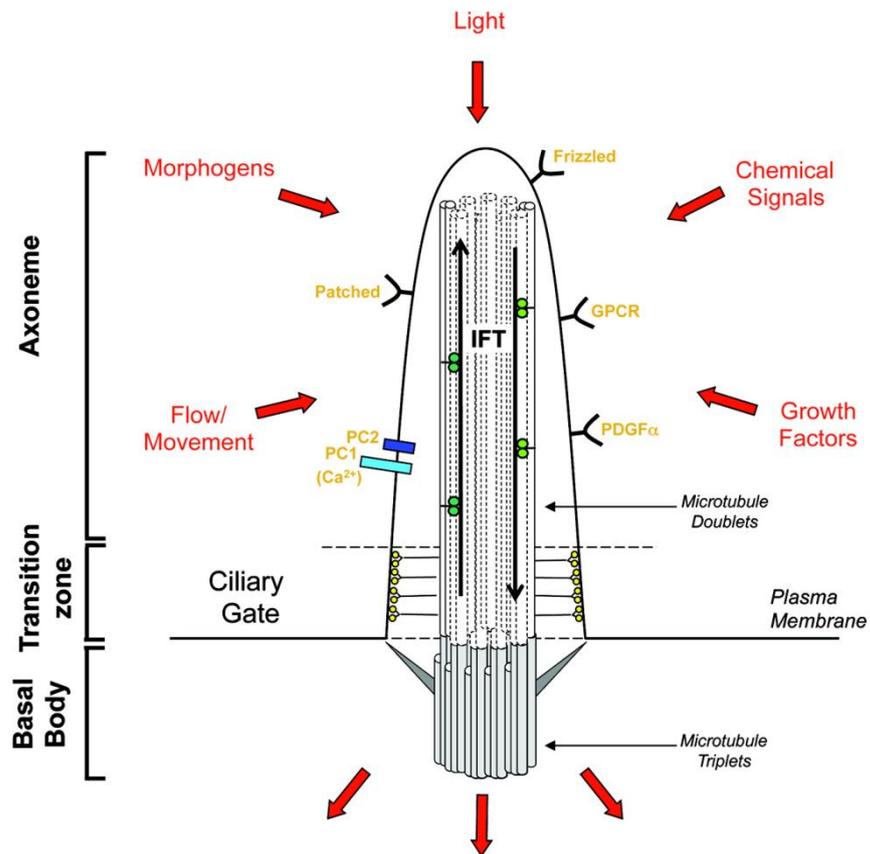
En el proteoma ciliar se identifican más de 1000 proteínas. Las mutaciones en los genes codificantes de un gran número de ellas han sido identificadas y son las productoras de ciliopatías.

Los mecanismos por los que la disfunción ciliar produce dichas enfermedades y fenotipos aún no está claro, sin embargo las vías de señalización Hedgehog y Wnt, parecen estar involucradas. Además, dada la función de transducción de señales externas del cilio, se puede sospechar que los distintos fenotipos sean una consecuencia de la transducción de señales aberrantes.<sup>16</sup>

La mayoría de las ciliopatías, se transmiten por herencia autosómica recesiva por lo que para que se produzca disfunción del cilio, los dos alelos del gen deben estar mutados. Incluso en el caso de la Poliquistosis Hepática Autosómica Dominante (la más frecuente) se cree que el segundo alelo también debe presentar cierta alteración para el desarrollo de la enfermedad. Uno de los rasgos más intrigantes de las ciliopatías es la variedad de síntomas clínicos y la implicación de numerosos órganos debidos a la mutación de un mismo gen. De este modo, un mismo gen mutado puede suponer una enfermedad letal embrionaria para un individuo y en otro ocasionar un desorden de inicio mucho más tardío. Esta condición, se cree que se produce de dicho modo porque en primer lugar, se requieren dos mutaciones (una por cada alelo del gen), pudiendo estas ser distintas. En segundo lugar, las distintas combinaciones de mutaciones posibles pueden dar lugar a los diferentes síntomas. En último lugar, los genes que codifican las proteínas ciliares son polimórficos pudiendo actuar como modificadores fenotípicos en presencia de otras mutaciones causantes de enfermedades. Por otra parte, estos polimorfismos que por sí mismos no causan enfermedad, en combinación pueden provocar síntomas lo que se conoce como “enfermedad oligogénica”<sup>17</sup>.

Disease	BBS	OFD1	Senior-Loken	Meckel	Joubert
Retinitis pigmentosa	✓		✓	✓	✓
Renal cystic disease	✓	✓	✓	✓	✓
Polydactyly	✓	✓		✓	✓
<i>Situs inversus/Isomerism</i>	✓		✓	✓	✓
Mental retardation/developmental delay	✓	✓		✓	✓
Hypoplasia of corpus callosum	✓	✓		✓	✓
Dandy-Walker malformation	✓		✓	✓	✓
Posterior encephalocele	✓*			✓	✓
Hepatic disease	✓	✓*	✓	✓	✓
Total number of phenotypes in each disorder	8	5	5	9	9

15. Distintas manifestaciones en las ciliopatías de Bardet Biedl (BBS), Síndrome orofaciocdigital 1 (OFD1), síndrome de Senior-Loken, síndrome de Meckel y síndrome de Joubert.<sup>17</sup>



Signaling Pathway	Hh	GPCRs	Wnt/PCP	Ca <sup>2+</sup>	TGFβ	RTKs	Notch		
Clinical Phenotypes	Mental Retardation	Obesity Deafness	Left-right asymmetry defects	Kidney cysts Infertility	Liver fibrosis	Diabetes Retinal degeneration Anosmia	Skeletal defects		
Organ	CNS	Kidney	Skeleton	Eye	Liver	Heart			
Syndromic Ciliopathies	MKS	JBTS	BBS	NPHP	OFD	SLS	AS	SRPS	EVC

16. Esquema del cilio primario y las vías de señalización controladas por la organela, los fenotipos clínicos y los órganos involucrados en las distintas ciliopatías: Meckel-Gruber Syndrome (MKS), Síndrome de Joubert (JBTS), Síndrome de Bardet-Biedl (BBS), Nefronoptosis (NPHP), Síndrome orofacialdigital (OFD), Síndrome de Senior Loken (SLS), Síndrome de Alstrom (AS), Síndrome de Costillas cortas y polidactilia (SRPS), Síndrome de Ellis van Creveld (EVC).  
17

La poliquistosis renal fue la primera patología que se identificó como ciliopatía. Presenta dos tipos de herencia: autosómica dominante y autosómica recesiva. En ella, al igual que en la poliquistosis hepática e se han identificado mutaciones en los genes PKD1 Y PKD2, codificantes de proteínas de membrana del cilio, las policistinas.



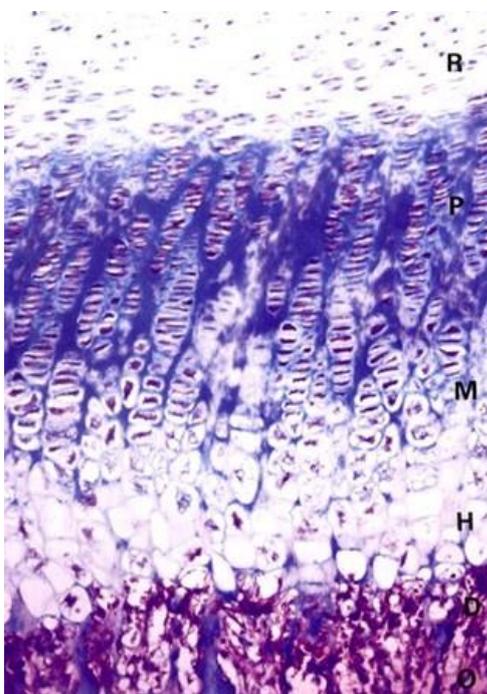
17. Poliquistosis Renal Autosómica Dominante.<sup>18</sup>

#### 4.- DESARROLLO DEL HUESO.

Los huesos pueden desarrollarse a partir de la diferenciación de células mesenquimales por dos mecanismos: osificación intramembranosa y osificación endocondral.

La osificación intramembranosa es propia de huesos planos del cráneo y de la cara y consiste en la diferenciación de células mesenquimales embrionarias en osteoblastos que formaran el centro de osificación y alrededor del cual se origina el hueso <sup>12</sup>.

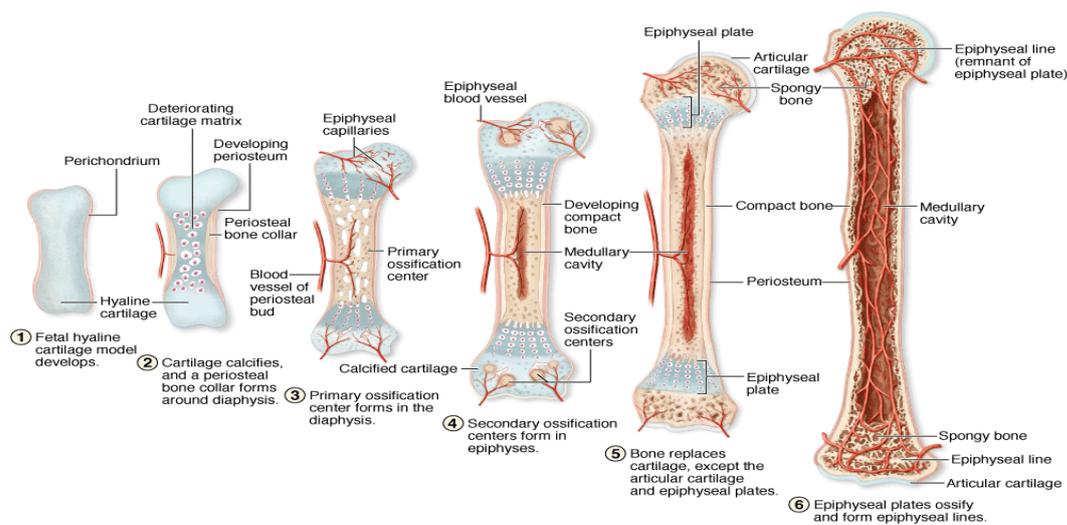
La osificación endocondral es el mecanismo de formación de la mayoría de huesos largos y tiene lugar en etapas tempranas de la embriogénesis en las que células mesenquimales se condensan en distintos puntos de la esqueletogénesis con la posterior diferenciación a condrocitos, formando los moldes de cartílago de los futuros huesos. Una vez diferenciados los condrocitos, estos proliferan y secretan colágeno tipo II formando su matriz extracelular. Las células circundantes al molde cartilaginoso se diferencian en células fibroblásticas de las que posteriormente surgirán los osteoblastos del collar óseo, formando así el pericondrio <sup>12</sup>. El siguiente paso tendrá lugar en los condrocitos centrales del molde los cuales se hipertrofian y secretan matriz extracelular rica en colágeno X, el cual favorece la calcificación de la matriz.



Además se produce la secreción de factores como VEGF, que permite la angiogénesis y la invasión de osteoblastos, lo que dará lugar al centro de osificación primario o esponjosa primaria.

Finalmente los condrocitos hipertróficos mueren por apoptosis, produciéndose la sustitución de cartílago por tejido óseo. En etapas posteriores, a los lados de la esponjosa primaria aparecen estratos de condrocitos de reserva, en la parte distal del hueso. Estos condrocitos son proliferativos e hipertróficos y constituyen la placa de crecimiento, los cuales permitirán el crecimiento longitudinal del hueso. <sup>20</sup>

**18.** Osificación endocondral (HE). Se identifican las distintas zonas: de reposo (R), de proliferación (P), de maduración (M), de hipertrofia (H) y de osificación (O) <sup>19</sup>.



## 19. Osificación endocondral.<sup>12</sup>

### 4.1.- PAPEL DE IHH Y OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA OSIFICACIÓN.

Indian hedgehog homolog (Ihh) tiene un papel fundamental en la formación del hueso. Los condrocitos prehipertrofos secretan moléculas de Ihh y éstas difunden en la placa de crecimiento generando un gradiente de señal lo que provoca la diferenciación y proliferación de los condrocitos, así como la osificación del pericondrio. Por un lado Ihh actúa sobre los condrocitos periarticulares secretando hormona paratiroidea PTH1, que difunde al centro del hueso y actúa sobre su receptor (Parathyroid Hormone 1 Receptor, PTH1R), retrasando la diferenciación de condrocitos proliferativos a hipertrofos y por tanto la síntesis de Ihh. De esta manera se establece un bucle de retroalimentación negativo entre PTHrP e Ihh que regula la diferenciación de los condrocitos a lo largo del eje longitudinal del hueso. Por otra parte se ha observado que Ihh también actúa estimulando la división de los condrocitos y la diferenciación de los osteoblastos del collar óseo, ya que los ratones *Ihh*<sup>-/-</sup> presentan una reducción del 50% de la división celular y carecen de osteoblastos.<sup>12</sup>

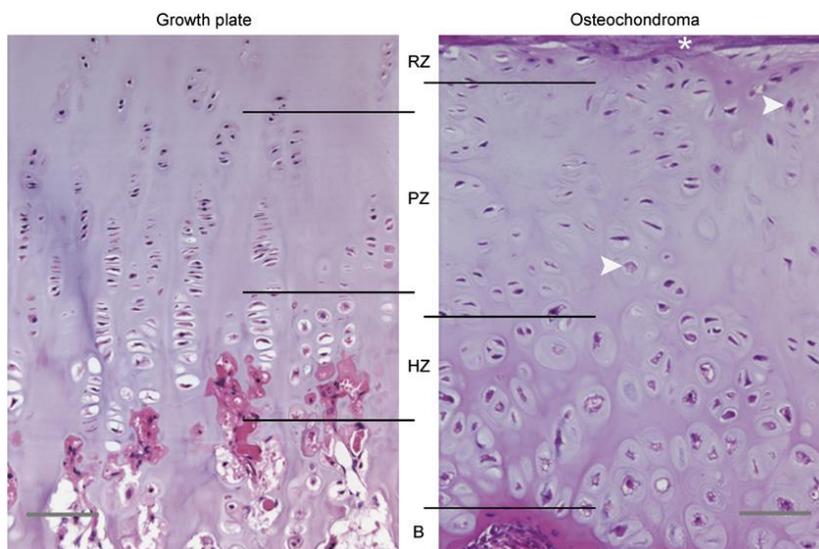
El factor de crecimiento de fibroblasto (Fibroblast Growth Factor, FGF), cuyos receptores (FGFR) se expresan en diferentes regiones de la placa de crecimiento también tienen su papel en la osificación (Ornitz and Marie, 2002). Así alteraciones en FGFR3 tienen repercusión en la placa de crecimiento ocasionando distintas osteocondrodisplasias en humanos.<sup>12</sup>

La ruta canónica Wnt/ $\beta$ -catenina es otra vía de señalización clave en el desarrollo del hueso ya que interviene en el proceso de diferenciación de los osteoblastos. Así en ratones con el gen codificante para  $\beta$ -catenina mutado, las células mesenquimales que deberían dar lugar a osteoblastos se diferencian a condrocitos<sup>12</sup>.

También las Proteínas Morfogenéticas del hueso (BMP) participan en el crecimiento y diferenciación del cartílago y para que ello se produzca de la manera adecuada deben actuar en paralelo con *Ihh*. Estas proteínas se expresan de manera distinta en la placa de crecimiento, así BMP2, -3, -4, -5 y -7 se expresan en el pericondrio, BMP2 y -6 en los condrocitos hipertróficos y BMP7 en los proliferativos<sup>12</sup>.

Finalmente otros genes clave en el desarrollo óseo son los factores transcripcionales Runx2 (también llamado *Cbfa1*) y los cuales son imprescindibles para la diferenciación de los osteoblastos, ó Sox9 que está implicado en la formación de las condensaciones mesenquimales previas a la formación de los moldes cartilagosos y es un marcador de los condrocitos proliferativos<sup>12</sup>.

En resumen la formación del hueso es un proceso complejo dirigido por *Ihh* pero en el que interviene un gran número de cascadas de señalización distintas, las cuales se encuentran perfectamente coordinadas.



**18.** Histología de la placa de crecimiento y del osteocondroma. Se visualizan: zona de reposo (RZ), zona de proliferación (PZ), zona de hipertrofia (HZ) y zona de osificación (B). En la placa de crecimiento la

organización de las columnas se mantiene mientras que en el osteocondroma las columnas no siguen una disposición regular. Además en el osteocondroma aparecen condrocitos hipertróficos en la zona de proliferación y de “descanso” (puntas de flecha)<sup>20</sup>.

## 5. EL CILIO PRIMARIO COMO SENSOR EXTRACELULAR EN EL HUESO.

El esqueleto de vertebrados sanos está compuesto de cartílago, hueso y otros tejidos conectivos. Su formación y homeostasis son reguladas por las vías wnt, Hedgehog, Notch, así como por proteínas modificadoras óseas<sup>20</sup>. De este modo el cilio vuelve a tener un papel relevante en el proceso de desarrollo óseo.

Los cilios primarios se identificaron por primera vez en el esqueleto en los **condrocitos** hace unos 40 años y hasta ahora los estudios realizados han confirmado las funciones biológicas de la organela en el tejido cartilaginoso<sup>20</sup>.

Uno de los hallazgos encontrados, es el cómo el cilio primario es capaz de orientar a los condrocitos de manera longitudinal al hueso formando columnas paralelas, las cuales darán lugar a la placa de crecimiento<sup>20</sup>.

La interacción entre moléculas de la matriz extracelular y sus receptores pueden transmitir señales directamente o indirectamente dentro de la célula que conducen a una cascada de señalización y expresión coordinada de varios genes implicados en adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación y muerte celular especialmente a través de integrinas.

Los proteoglicanos de la matriz tienen un importante papel en la señalización intercelular. Se unen a moléculas señalizadoras como factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) y otros, regulando su actividad.

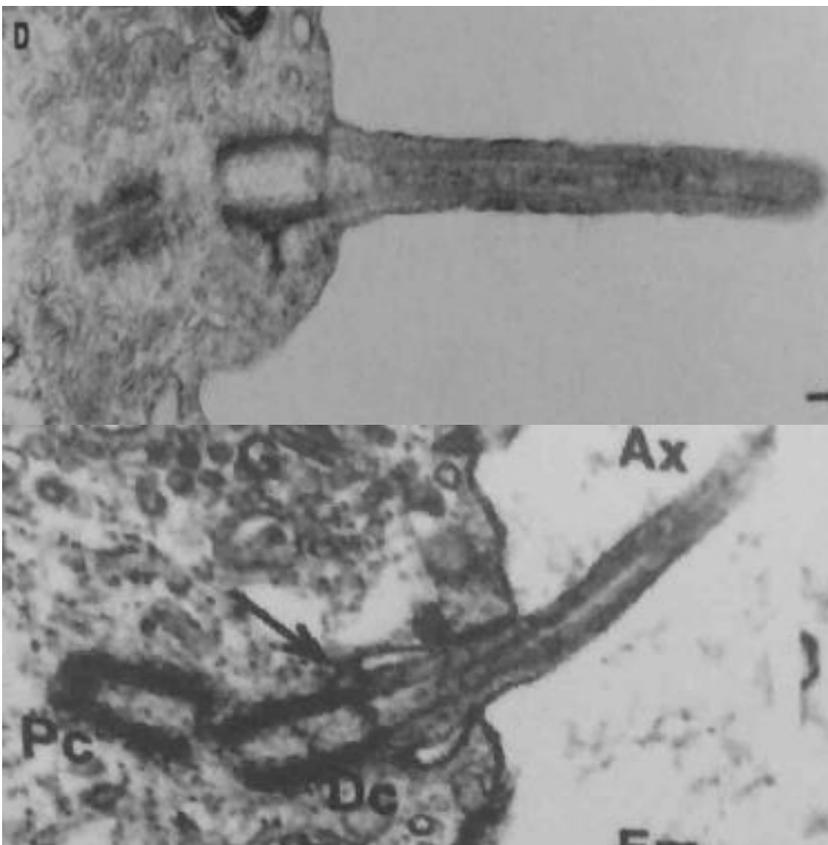
Estudios llevados a cabo por Wang et al. 2013, demostraron como la vía de señalización HH es fundamental para el desarrollo del tejido óseo<sup>21</sup>. Jensen et Al, demostraron como la matriz extracelular es capaz de transducir señales al interior de la célula a través del cilio y el aparato de Golgi<sup>22</sup>. McGlashan et al realizaron un estudio en el que demostraron como la compresión mecánica disminuye la incidencia y longitud de los cilios de manera reversible, lo que sugiere un mecanismo de retroalimentación negativa ante señales excesivamente fuertes<sup>23</sup>.

Thompson et al investigaron la relación entre la carga mecánica y la señalización HH en condrocitos articulares. Así encontraron como la carga activa a la vía HH y la expresión de enzimas catabólicas de cartílago<sup>23</sup>.

En las **células óseas**, el cilio primario también está presente. Así, estudios con microscopía electrónica de transmisión (TEM), mostraron como los osteocitos se disponían en orientación perpendicular al eje largo de la tibia<sup>23</sup>. Además, los cilios participan en la diferenciación de

osteoblastos y la pérdida de los mismos produce un deterioro en esta diferenciación. Nuevos estudios demostraron como los cilios primarios también están presentes en células madre mesenquimatosas (MSC)<sup>22</sup>. Parece ser además que los osteocitos estimulados actúan de manera paracrina secretando factores solubles que aumentan la expresión de genes osteogénicos en las células madre mesenquimales<sup>22</sup>. Este mecanismo paracrino desaparece con la supresión del cilio primario, lo que sugiere que el cilio es requerido por los osteocitos para captar un estímulo mecánico externo como el flujo de fluido intersticial y generar la señal para las células efectoras que regulan la formación de hueso. En osteoclastos no se han identificado cilios primarios, ni en las células hematopoyéticas de las que derivan<sup>22</sup>. Sin embargo, se ha demostrado como el cilio regula indirectamente los osteoclastos algunos estudios han demostrado que los cilios en los osteoblastos / osteocitos regulan indirectamente incrementando la relación de la osteoprotegerina (OPG) con el activador del receptor del ligando Kappa B del factor nuclear (RANKL) en el microambiente óseo<sup>22</sup>.

El cilio primario actúa como quimio y mecanosensor de estímulos extracelulares. De este modo, se ha demostrado que el cilio primario cambia su curvatura con el flujo para conseguir a través de AMPc, un incremento del paso de  $Ca^{2+}$  intracelular<sup>1</sup>. Además se ha visto como la disminución del AMPc produce una mayor expresión de genes osteogénicos<sup>1</sup>.



**19 y 20.** Cilio primario en condrocito (19) y en osteocito (20) ambas vistas por Microscopio electrónico de transmisión.<sup>22</sup>

## 6. CILIO PRIMARIO Y OSTEOCONDRODISPLASIAS.

Las osteocondrodisplasias son un grupo heterogéneo de enfermedades cuyo rasgo común es el trastorno del desarrollo esquelético o de la dinámica ósea y cartilaginosa. La mayoría son hereditarias pudiendo en muchos casos formar parte de síndromes complejos en los que la alteración ósea es sólo una parte de las múltiples manifestaciones fenotípicas.

Las displasias esqueléticas constituyen los defectos congénitos más frecuentes en el recién nacido, con una frecuencia alrededor de 2 por cada 1000 recién nacidos, y son responsables del 9.1% de las muertes perinatales. El 23% de los fetos afectados fallecen durante la vida intrauterina y el 32% en la primera semana de vida.

Las primeras clasificaciones de enfermedades constitucionales del hueso de 1977 y 1983 agruparon las distintas entidades patológicas por su correlación fenotípica y radiológica en familias con similitudes morfológicas y patogenéticas<sup>24</sup>. En 1992, con los avances moleculares, se realiza una nueva clasificación, en la cual las entidades se agrupan por la anomalía bioquímica identificada, estableciendo su etiopatogenia y su relación con defectos conocidos en genes o proteínas de éstos desórdenes. Además en cada una de las entidades está recogida su tipo de herencia mendeliana, así como el número de catálogo "McKusick Mendelian Inheritance in Man (OMIM)"<sup>25</sup>. Los genes identificados se van añadiendo a la clasificación en las sucesivas revisiones.

### **INTERNATIONAL NOMENCLATURE OF CONSTITUTIONAL DISEASES OF BONE 1983<sup>24</sup>**

#### **OSTEOCHONDRODYSPLASIAS**

Abnormalities of cartilage and/or bone growth and development

Identifiable at birth:

-Usually lethal before or shortly after birth.

1. Achondrogenesis type I (Parenti- Fraccaro).
2. Achondrogenesis type II (Langer- Saldino).
3. Hypochondrogenesis.
4. Fibrochondrogenesis.
5. Thanatophoric dysplasia.
6. Thanatophoric dysplasia with clover-leaf skull.
7. Atelosteogenesis.
8. Short rib syndrome (with or without polydactyly).
  - a. Type I (Saldino- Noonan).
  - b. Type II (Majewski).
  - c. Type III (lethal thoracic dysplasia).

<b>Short-rib dysplasia (with or without polydactyly) group</b>	<b>Inheritance</b>	<b>MIM Nº</b>	<b>Locus</b>	<b>Gen</b>	<b>Protein</b>
<u>Chondroectodermal</u>	AR	<a href="#">225500</a>	4p16	EVC1	EvC gene 1
<u>dysplasia (Ellis-van Creveld</u>	AR		4p16	EVC2	EvC gene 2
<u>SRP type 1/3</u> ( <u>Saldino- Noonan/Verma- Naumoff</u> )	AR	263510			
<u>SRP type 2</u> ( <u>Majewski</u> )	AR	263520			
<u>SRP type 4 (Beemer)</u>	AR				
<u>Oral-Facial-Digital syndrome type 4</u> ( <u>Mohr-Majewski</u> )	AR	258860			
<u>Asphyxiating thoracic dysplasia (ATD; Jeune)</u>	AR	208500			
<u>Thoracolumbar dysplasia (Barnes)</u>	AD	187760			

**21.** Grupo de displasias con costillas cortas con/sin polidactilia acorde a la revisión de 2006 de la clasificación de desórdenes óseos genéticos <sup>25</sup>.

La clínica de las osteocondrodisplasias es distinta en cada una de ellas, aunque presentan una serie de rasgos fenotípicos muy comunes como enanismo, con un crecimiento desproporcionado entre extremidades y tronco y deformaciones de los huesos pudiendo llegar a producir insuficiencia respiratoria por deformaciones en la caja torácica entre otros. Al igual que en la clínica, la evolución y el pronóstico varían entre ellas, desde formas letales en el nacimiento a otras compatibles con la vida <sup>26</sup>.

El diagnóstico en la mayoría de los casos es clínico-radiológico, por lo que se le realizan radiografías en todo el cuerpo a los niños afectados. El diagnóstico prenatal de una displasia esquelética específica es posible si existe el conocimiento de antecedentes en la familia. Para ello se realiza un examen ultrasonográfico, si bien en ausencia de conocimiento de los antecedentes, llegar al diagnóstico exacto resulta casi imposible. Se considera conveniente que

ante la presencia de determinados hallazgos en un examen ultrasonográfico, las gestantes sean remitidas a centros de Genética Médica con el fin de realizar un diagnóstico molecular, posible en algunos casos, así como para asesoramiento y consejo genético. Los hallazgos a tener en cuenta en la ultrasonografía son: acortamiento del fémur fetal u de otro hueso tubular, una desproporción entre la longitud de huesos largos y el diámetro biparietal o la circunferencia cefálica, así como de cualquier otra alteración ósea fetal <sup>26</sup>.

El tratamiento en la mayoría de los casos, es quirúrgico paliativo, y dependerá del grado de afectación individual. De esta forma, las intervenciones quirúrgicas consisten principalmente en alargamiento quirúrgico de extremidades y recambios articulares, con el fin de que tengan una mejor calidad de vida. <sup>26</sup>

En esta revisión, se ha estudiado la relación existente entre el grupo de síndromes de costillas cortas con o sin polidactilia y el cilio primario. También se estudia la relación del cilio primario y la Osteocondromatosis múltiple hereditaria.

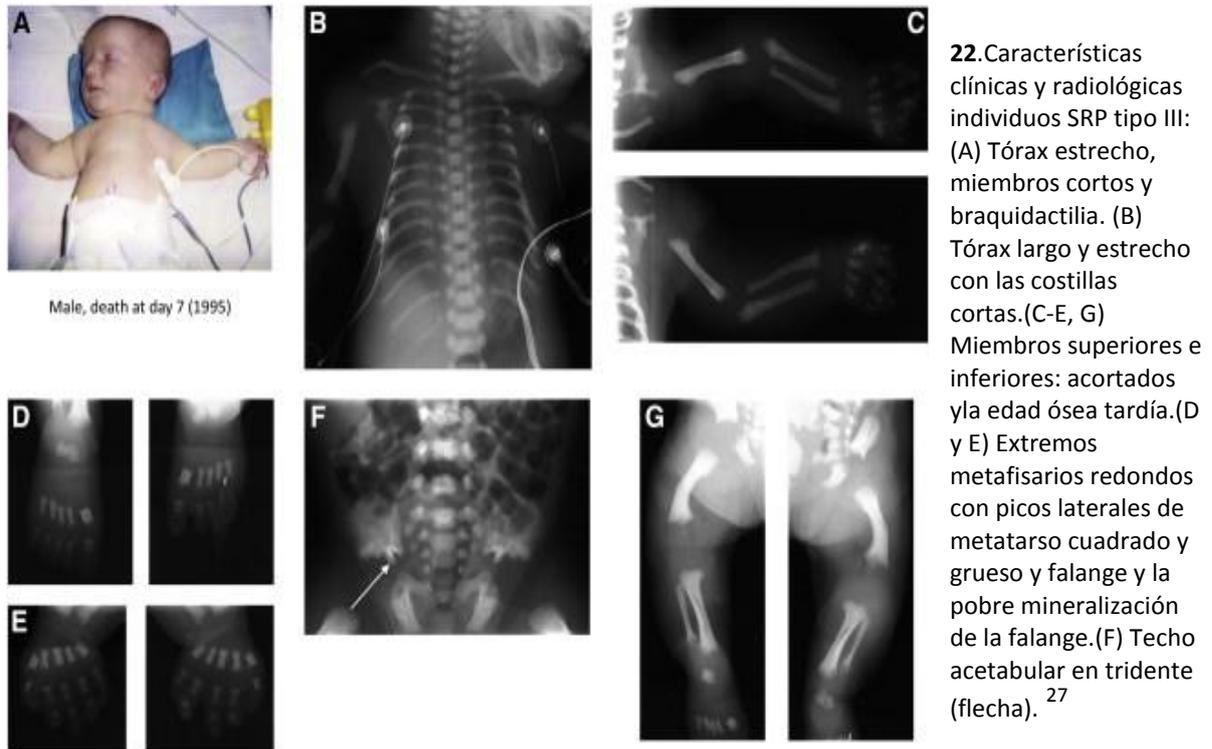
### **6.1. SÍNDROMES DE COSTILLAS CORTAS Y POLIDACTILIA.**

El grupo de displasias de costillas cortas (SRP, short rib polidactilia) está dentro del espectro de las ciliopatías. Su incidencia es escasa y se definen como síndrome de hipocrecimiento con extremidades cortas, polidactilia y tórax muy estrecho con costillas cortas. A este grupo pertenecen los síndromes de Saldino-Noonan (SRP tipo I, MIM # 263530), Majewski (SRP tipo II, MIM # 263520), Verma-Naumoff (SRP tipo III, MIM # 263510), Beemer-Langer (SRP tipo IV, MIM # 269860), síndrome de Jeune o displasia torácica asfixiante ( ATD, MIM # 208500) y el síndrome de Ellis van Creveld (EVC, MIM #225500), todos ellos displasias esqueléticas de herencia autosómica recesiva <sup>27</sup>.

#### **6.1.1. SÍNDROME DE VERMA-NAUMOFF (SRP tipo III)**

El síndrome de costillas cortas y polidactilia tipo III, o **síndrome de Verma-Naumoff**, (SRP tipo III [MIM 263510]) es una condrodisplasia autosómica recesiva letal al en el periodo perinatal caracterizada por costillas cortas, un tórax estrecho, huesos largos cortos, un acetábulo anormal y numerosas malformaciones extraesqueléticas, El SRP tipo III es letal como resultado de la hipoplasia pulmonar por el severo estrechamiento torácico <sup>27</sup>.

El SRP tipo III comparte rasgos fenotípicos y radiológicos con el síndrome de Jeune. En ambos aparecen costillas cortas y pelvis en tridente, sin embargo las anomalías radiográficas son mayores en el SRP tipo III, cuyos acortamientos metafisarios son más pronunciados <sup>28</sup>.



Actualmente se conocen las mutaciones en los genes ***IFT80***, ***DYNC2H1*** en el SRP tipo III, los cuales codifican proteínas del transporte intraflagelar del cilio primario. Además se ha identificado mutaciones en el gen ***WDR34***. La **proteína *WDR34*** está implicada en la formación de vesículas durante la ciliogénesis y en el IFT.<sup>27</sup>

La investigación llevada a cabo por Huber et al. 2013, reveló como los cilios primarios de fibroblastos con ***WDR34*** mutado eran significativamente más cortos de lo normal y tenían una punta bulbosa<sup>27</sup>.

La identificación de las mutaciones ***WDR34*** en cuatro familias con SRP tipo III demostraron que es un regulador negativo de la vía de activación de NF-κB inducida por IL-1R / TLR3 / TLR4 y está implicado en la patogénesis de las ciliopatías esqueléticas<sup>28</sup>.

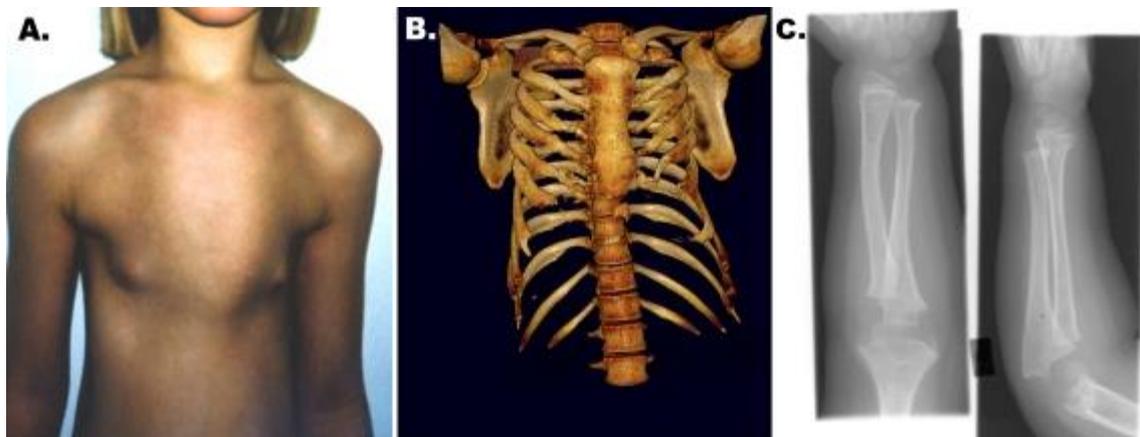
En el 2013, un estudio realizado por M. McInerney- Leo et al., descubrieron dos nuevas mutaciones en el gen ***WDR60***, en un paciente afecto por SRPS tipo III. Este gen, codifica proteínas encontradas en el cuerpo basal del cilio primario de los condrocitos. Al parecer, la ciliogénesis en los fibroblastos de este paciente se vio afectada por lo que se considera que ***WDR60*** puede causar defectos en el desarrollo condroesquelético por su implicación en el cilio<sup>28</sup>.

### 6.1.2. DISPLASIA TORÁCICA ASFIXIANTE DE JEUNE.

La **displasia torácica asfixiante de Jeune** (JATD, MIM#208500) es una condrodisplasia autosómica recesiva rara que causa en la mayoría de los casos muerte infantil como resultado de un tórax severamente estrecho el cual produce insuficiencia respiratoria por hipoplasia pulmonar <sup>29</sup>.

Los rasgos fenotípicos de este síndrome se correlacionan con los del síndrome de Verma-Namouff. Los signos clínicos de este síndrome son tórax estrecho con costillas cortas, pelvis en tridente, y acortamiento rizomélico de las extremidades. Además aparece polidactilia postaxial, braquidactilia, hidrocefalia y aplasia retiniana. Además en algunos casos de JATD han aparecido enfermedad renal quística y nefronopstisis (enfermedades producidas por la disfunción del cilio primario) <sup>28</sup>.

Para su diagnóstico se requiere la confirmación radiológica. Los hallazgos en la JATD son la presencia de extremidades metafisarias radiológicamente irregulares, condrocitos proliferativos histopatológicamente hiperplásticos y mineralización endocondral defectuosa <sup>29</sup>.



**23.** Manifestaciones esqueléticas del síndrome de Jeune. A: Tórax estrecho en paciente con JATD. B TAC del mismo paciente que demuestra costillas cortas y jaula torácica estrecha. C. Radiografía de extremidades superiores en paciente con Síndrome de Mainzer-Saldino con acortamiento acrosomélico, metafisis irregulares y epífisis crónicas <sup>29</sup>

La distrofia torácica asfixiante Jeune es un trastorno genéticamente heterogéneo. Beales et al. Identificaron dos mutaciones en el gen codificante de una de las proteínas del transporte intraflagelar, **Ift80**, del cilio primario. Esta proteína se localiza en el cuerpo basa del cilio de las células condrocíticas. La alteración en esta proteína produce una señal aberrante de Shh lo que

parece ser el mecanismo productor del síndrome. En ratones *lhh* disfuncionante presentaron los mismos rasgos fenotípicos que los pacientes con JATD, con cajas torácicas extremadamente cortas y estrechas<sup>30</sup>.

### 6.1.3. SÍNDROME DE ELLIS VAN CREVELD.

El **síndrome de Ellis- van Creveld** (EVC MIM 225500) es una enfermedad autosómica recesiva también conocida como displasia condro-ectodérmica, producida por la mutación de los genes ***EVC 1 O EVC2***. La gravedad de la enfermedad varía de una persona a otra, presentando una mortalidad natal del 30%. Esta enfermedad tiene su mayor tasa de afección en Pensilvania, en la población de la Vieja Orden Amish, apareciendo sobre todo en descendientes de consanguíneos<sup>12</sup>.

Los pacientes con EVC presentan alteraciones en el desarrollo esquelético y de la ectodermis. Los rasgos clínicos esqueléticos más frecuentes son la talla baja desproporcionada por acortamiento de huesos largos (Talla final 1-1,5m), el tórax estrecho y acortamiento de las costillas y la polidactilia postaxial bilateral en manos y en un 10% de casos en pies<sup>12</sup>.

En los estudios radiológicos se observan huesos tubulares, pelvis en tridente por hipoplasia del acetábulo, hipoplasia de epífisis tibiales (ocasionan genu valgo) y fusión de los huesos carpianos<sup>12</sup>.

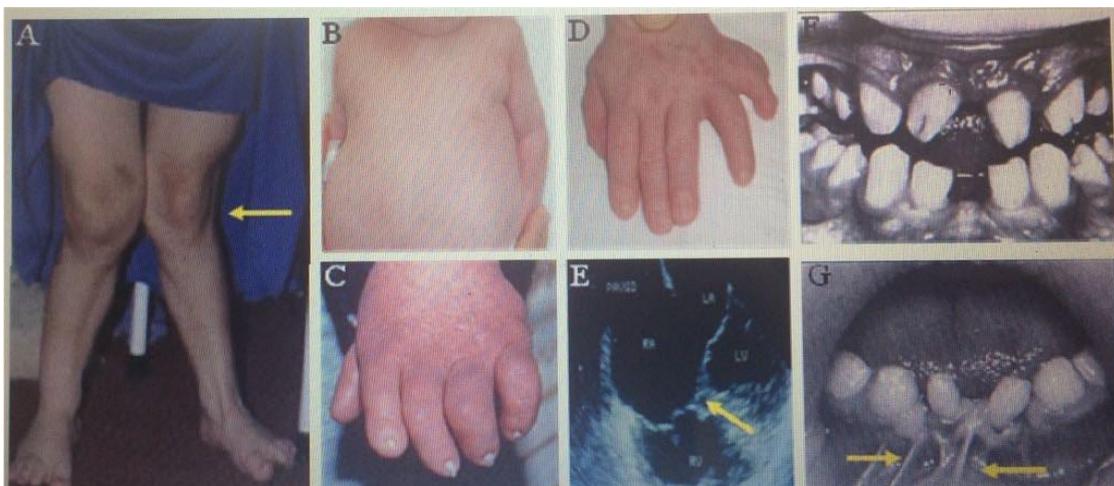
La alteración ectodérmica produce distrofia ungueal y anomalías dentales (dientes pequeños, cónicos, hipodoncia y dientes neonatales). Además se producen alteraciones orofaciales como tabique nasal ancho, labio leporino y frenillo múltiple<sup>12</sup>.

Por último, aparecen malformaciones cardíacas siendo la más frecuente la comunicación interauricular aunque pueden existir muchas otras como transposición de grandes vasos, hipoplasia del ventrículo izquierdo, estenosis de la válvula pulmonar, etc.<sup>12</sup>.

En estos pacientes se han descubierto mutados dos genes, *EVC1* y *EVC 2*. Ambos genes codifican proteínas que fueron localizadas en el cuerpo basal del cilio primario y actúan como mediadores positivos de la vía Hh<sup>31</sup>.

Un estudio llevado a cabo por Long et al., 2004, mostró como la supresión de *Evc* suponía la represión de la vía de señalización Indian Hedgehog, de manera que *Evc* parece ser determinante en el funcionamiento de esta ruta<sup>40</sup>. Años más tarde, el Ruiz Pérez et al, confirmaron de nuevo dicho descubrimiento en ratones *Evc -/* en los cuales se producía un

defecto en la señalización *Ihh* y con ello la reducción de las columnas de las zonas de proliferación e hipertrofia de la placa de crecimiento de los condrocitos<sup>32</sup>.



**24.** Características clínicas de pacientes afectados con Evc. **A:** *genu valgo*. **B:** tórax estrechos. **C:** distrofia en las uñas. **D:** polidactilia postaxial en manos. **E:** malformación cardíaca: aurícula única. **F:** defectos dentales. **G:** múltiples frénulas entre la encía y el labio<sup>12</sup>.

Un estudio llevado a cabo por Long et al., 2004, mostró como la supresión de *Evc* suponía la represión de la vía de señalización Indian Hedgehog, de manera que *Evc* parece ser determinante en el funcionamiento de esta ruta<sup>40</sup>. Años más tarde, el Ruiz Pérez et al, confirmaron de nuevo dicho descubrimiento en ratones *Evc* -/ en los cuales se producía un defecto en la señalización *Ihh* y con ello la reducción de las columnas de las zonas de proliferación e hipertrofia de la placa de crecimiento de los condrocitos<sup>32</sup>.

El mismo estudio, comprobó que existe un retraso de las osteoblastogénesis así como de la osificación en ratones *Evc* -/-. La expresión de los genes diana de la ruta *Wnt*/ $\beta$ -catenina y otros marcadores de osteoblastos también estaba disminuida. El hueso en crecimiento y la región orofacial al igual que en el síndrome fueron los tejidos que más expresaron *Evc*.. Además, los ratones *Evc* -/ poseían el fenotipo esquelético propio de los pacientes con EVC, es decir, acortamiento de huesos y costillas así como defectos en incisivos y molares. La diferencia fue que no presentaron polidactilia, la cual está presente en todos los pacientes con EVC, ni malformaciones cardíacas<sup>32</sup>.

Además se detectó la presencia de importantes defectos en el desarrollo de la parte frontal de la base del cráneo en los ratones *Evc* -/-, indicando que *Evc* es esencial para el desarrollo de la sincondrosis craneales, especialmente la sincondrosis intraesfenoidal<sup>32</sup>.

#### 6.1.4. SINDROME OROFACIODIGITAL TIPO 1

Los **síndromes orofaciodigitales** (SOFD) corresponden a un grupo heterogéneo de desórdenes del desarrollo a nivel oral, facial y digital, como su nombre indica. Si bien, otros órganos pueden estar afectados lo que determinará el tipo de SOFD <sup>33</sup>.

El SOFD tipo I (OFD 1; OMIM #311200), a diferencia de los otros subtipos, es transmitido como un rasgo dominante ligado al cromosoma X, en el que los varones mueren intraútero <sup>33</sup>.

Los rasgos clínicos del SOFD tipo 1 afectan a la cavidad oral (frenillo aberrante, anomalías linguales y hendidura de la arcada palatina entre otras), craneofaciales (fisuras palpebrales, hipoplasia nasal, microretrognatia, milia evanescente, labio leporino y alopecia), esqueléticas (braquidactilia, sindactilia, polidactilia post y preaxial y baja estatura). Pueden aparecer además malformaciones del Sistema nervioso central como la agenesia del cuerpo calloso <sup>33</sup>.

En el SOFD tipo 1, se ha identificado la mutación en el gen **OFD1**, el cual codifica una proteína del centrosoma ciliar. De este modo, se ha observado una disminución de la ciliogénesis en esta enfermedad. Además se considera que *Ofd1* actúa en el centriolo distal, reclutando proteínas IFT y regulando los microtúbulos del centriolo para conseguir una longitud del cilio adecuada <sup>42</sup>. En embriones *Ofd1*<sup>-/-</sup> se han visto defectos en la disposición izquierda- derecha de las vísceras, por disfunciones nodales <sup>34</sup>.



**25.** Hallazgos clínicos en pacientes con SOFD1. A: hendidura en labio superior y paladar. B: braquidactilia C: alteraciones craneofaciales <sup>33</sup>.

## 6.2. EXOSTOSIS MÚLTIPLE HEREDITARIA.

La exostosis múltiple hereditaria (HME) o condromatosis múltiple es un trastorno autosómico dominante raro en el que aparecen múltiples osteocondromas y alteraciones esqueléticas.

Los osteocondromas están compuestos por tejido cartilaginoso maduro sin signos de malignidad. Dentro de los tumores primarios del hueso, representan un 10-20% y el 20-50% de los tumores benignos. El 70% aparecen en menores de 20 años ya que los osteocondromas frenan su crecimiento en la edad adulta.<sup>35</sup>

La clínica presente en la HME es generalmente de dolor local por la compresión de estructuras, así como deformidades esqueléticas o fracturas. Algunos de los hallazgos más frecuentes son la escoliosis, deformidades en el antebrazo, genu valgum y longitud asimétrica entre extremidades.<sup>35</sup>

El diagnóstico es meramente clínico y radiológico y no suelen requerirse pruebas genéticas.

Las complicaciones más frecuentes de la HME son las deformaciones ortopédicas que produce. Sin embargo, la más grave es la transformación de uno de los osteocondromas en condrosarcoma. El riesgo de malignificación es de un 10%. El seguimiento radiológico resulta fundamental para el control.<sup>35</sup>

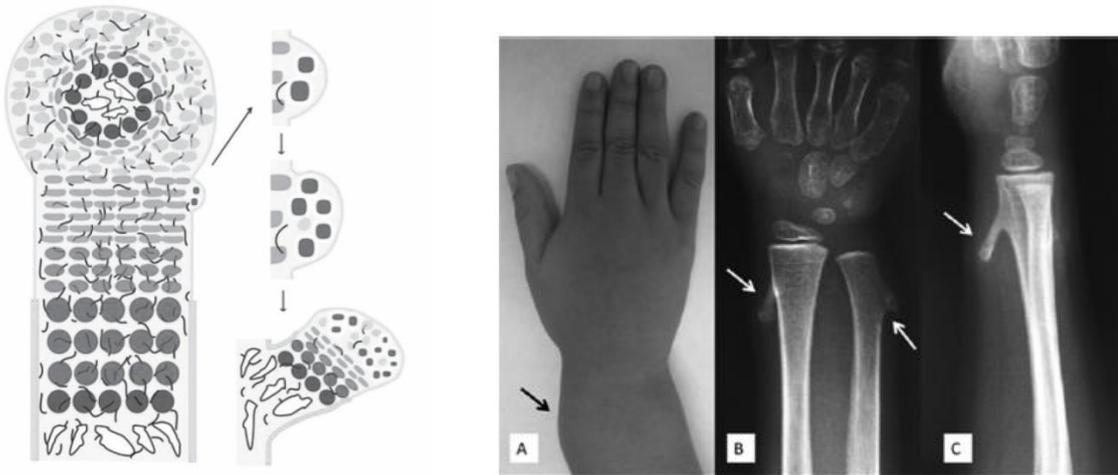
No existe un tratamiento curativo, de modo que el tratamiento se basa en la corrección quirúrgica de las complicaciones.<sup>35</sup>

En la HME, al igual que en el osteocondroma solitario, se han identificado mutaciones en los genes **EXT1** y **EXT2**, ambos codificantes de exostosinas, las cuales se ven involucradas en la síntesis de Heparán sulfato (HS)<sup>35</sup>.

El HS se une a proteínas extracelulares a través de los azúcares de proteoglicanos. El HS supone un regulador de distintas vías de señalización fundamentales para el desarrollo esquelético y en las que el cilio primario interviene, como IHH, WNT, PTHrP y FGF.<sup>35</sup>

Algunos estudios muestran como la alteración del HS parece modificar la vía Hedgehog en la que se produce un aumento de IHH. Este aumento de IHH condiciona una pérdida de polaridad en la placa de crecimiento y una mayor proliferación de condrocitos.<sup>35</sup>

Además la modificación de los factores de crecimiento parecen estar involucrados en la formación del osteocondroma. Aunque se han hecho progresos, el mecanismo molecular específico que conduce a la disrupción de la estructura del cartílago y la consiguiente formación de exostosis después de la pérdida del HS todavía no está clara.<sup>35</sup>



**26.** Proceso de formación de osteocondromas.<sup>35</sup> **25.** A: deformidad en zona radial. B y C: Osteocondroma en radio en estudio radiológico.<sup>35</sup>

## CONCLUSIONES

El estudio del cilio primario y de los genes que codifican proteínas ciliares de estructuras del cilio o de las vías de señalización que en él asientan de manera específica ha permitido conocer la etiopatogenia de un grupo de osteocondrodisplasias hasta hace poco de etiología desconocida como son las del grupo de costillas cortas con o sin polidactilia.

El gran avance en estudios genéticos ha propiciado que la clasificación y tipificación de las enfermedades óseas constitucionales elaborados por grupos de expertos ha cambiado sustancialmente en los últimos 25 años, desde la clasificación basada en los rasgos fenotípicos, radiológicos y tipo de herencia a las actuales clasificaciones etiopatogénicas basada en las mutaciones de genes que codifican proteínas anómalas que dan lugar en ocasiones a síndromes complejos en donde la mutación de una proteína da lugar a trastornos de diferentes órganos con expresión fenotípica variable.

El mayor conocimiento a nivel molecular de estas enfermedades no sustituye en modo alguno el papel fundamental del estudio clínico y estructural de las distintas patologías, como las osteocondrodisplasias, sino que los complementan. De esta manera creemos que en el primer enfoque diagnóstico de una determinada anomalía en el desarrollo esquelético siguen siendo útiles las clasificaciones de cuadros descriptivos morfológicos de las primeras clasificaciones.

La investigación sobre el cilio primario aunque ha progresado enormemente en los últimos años, aún tiene mucho camino que recorrer, ya que un conocimiento más profundo del mismo podría mejorar el diagnóstico de numerosas ciliopatías e incluso, abordar un tratamiento médico etiológico. Por ejemplo hay osteocondrodisplasias como la exostosis hereditaria múltiple en las que no hay alteraciones en las proteínas ciliares pero que hay mutaciones en genes que codifican proteínas de la matriz que de alguna forma hacen que la movilidad celular esta alterada y que posiblemente tenga que ver con alteraciones de la señalización del cilio

Gracias a las técnicas de visualización como el microscopio electrónico de transmisión, la microscopía electrónica de barrido y las técnicas inmunohistoquímicas, la identificación y el estudio del cilio primario en las distintas investigaciones ha sido posible, así la visualización de sus variaciones a lo largo de los experimentos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Satir, P. and Christensen, S. Structure and function of mammalian cilia. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129(6): 687-693.
2. Hiroshi Watanabe, Heiko A Schmidt, Anne Kuhn, Stefanie K Höger, Yigit Kocagöz, Nico Laumann-Lipp, et al. Nodal signalling determines biradial asymmetry in Hydra. *Nature:* 2014; 515(7225): 111-115
3. Sorenson, T. (2017). EM 077 Respiratory Epithelium. [online] *Histologyguide.org*. Available at: <http://histologyguide.org/EMview/EM-077-respiratory-epithelium/em17.html> [Accessed 20 May 2017].
4. Michael H. Ross. *Histología*. Google Books. p. 116. Consultado el 24 de marzo de 2014.)
5. Robinson, D. (2017). Helen Dawe University of Exeter. [online] *Biosciences.exeter.ac.uk*. Available at: [http://biosciences.exeter.ac.uk/staff/index.php?web\\_id=helen\\_dawe&tab=research](http://biosciences.exeter.ac.uk/staff/index.php?web_id=helen_dawe&tab=research) [Accessed 20 May 2017].
6. Yuan, X., Serra, R. and Yang, S. Function and regulation of primary cilia and intraflagellar transport proteins in the skeleton. *An N Y Acad Sci.* 2014; 1335(1): 78-99.
7. Huang, B. Isolation and characterization of cholangiocyte primary cilia. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiolog* 2006; 291(3):.G500-G50

8. Dentler, W. Intraflagellar transport (IFT) during assembly and disassembly of *Chlamydomonas* flagella. *J Cell Biol.* 2005; 170(4): 649-659.
9. Badano, J., Mitsuma, N., Beales, P. and Katsanis, N. The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annu Rev Genomics Human Genet.* 2006; 7(1): 125-148.
10. Arias L. Enf\_Quísticas y del desarrollo [Internet]. *Kidney pathology.com.* 2017 [cited 31 May 2017]. Available from: [http://www.kidney pathology.com/Enf\\_quísticas\\_dlo.html](http://www.kidney pathology.com/Enf_quísticas_dlo.html)
11. Hildebrandt, F., Benzing, T., and Katsanis, N.. Ciliopathies. *N Engl J Med.* 2011; 364: 1533-1543.
12. Valencia Benítez, M. Estudio de las bases moleculares de los síndromes de Ellis-van Creveld y Weyers Acrofacial Dysostosis y análisis del papel de Evc en la placa de crecimiento. Licenciada en Biología. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. 2012.
13. Darian, F., Zulema, R., & Lucía, G. 2016 oct 6. Ciliopatías en el sistema nervioso. *Morfovirtual* 2016. [Online]
14. Praetorius, H.A. and Spring K. R. (2005). A physiological view of the primary cilium. *Annu. Rev. Physiol.* 2005; 67: 515-529.
15. Alberts B, Johnson A, Lewis. Signaling Pathways That Depend on Regulated Proteolysis. En: Alberts B, Johnson A, Lewis J. ed., *Molecular biology of the cell*, 4th ed. New York: Garland Science; 2012: 946-953.
16. Waters, A. and Beales, P. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr Nephrol* ,2011 26(7): 1039-1056.
17. Fry, A., Leaper, M. and Bayliss, R. The primary cilium: guardian of organ development and homeostasis. *Organogenesis*,2014; 10(1): 62-68.
18. Vispo, N. (2017). Enfermedad Poliquistica. [online] *Revista bionatura.* Available at: <http://www.revistabionatura.com/enfermedad-poliquistica.html> [Accessed 24 May 2017].
19. Mescher AL: *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, 12<sup>th</sup> Edition Medic.ula.ve. (2017). histoweb. [online] Available at: <http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/atlas/10/endocondralhe.htm> [Accessed 25 May 2017].
20. de Andrea, C., Wiweger, M., Prins, F., Bovée, J., Romeo, S. and Hogendoorn, P. Primary cilia organization reflects polarity in the growth plate and implies loss of polarity and mosaicism in osteochondroma. *Lab Invest.* 2010; 90(7): 1091-1101.
21. Wang S, Wei Q, Dong G, Dong Z.. ERK-mediated suppression of cilia in cisplatin-induced tubular cell apoptosis and acute kidney injury. *Biochim Biophys Acta* . 2013; 1832(10):1582-1590. [PubMed]
22. Jensen C, , Poole CA, McGlashan SR, Marko M, Issa ZI, Vujcich KV, Bowser SS. Ultrastructural, tomographic and confocal imaging of the chondrocyte primary cilium in situ. *Cell bio int.* 2004;28:101–110. [PubMed]
23. McGlashan SR, Haycraft CJ, Jensen CG, Yoder BK, Poole CA. Articular cartilage and growth plate defects are associated with chondrocyte cytoskeletal abnormalities in Tg737<sup>orpk</sup> mice lacking the primary cilia protein polaris. *Matrix biol.* 2007;26 (4):234–246. [PubMed]
24. International Nomenclature and Classification of the Osteochondrodysplasias (1997). International Working Group on Constitutional Diseases of Bone. *Am J Med Genet.* 1998; 79:376-382.
25. Superti-Furga A, Unger S. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2006 revision. *AJMG Part A.* 2007;143A(1):1-18.
26. Le Merrer M. Osteocondrodysplasias letales. *EMC - Aparato Locomotor.* 2016;49(2):1-7
27. Algora Hernández A, Taboada Lugo N, Rodríguez Royero L, Anoceto Armiñana E. Diagnóstico prenatal de una osteocondrodysplasia letal: síndrome de costillas cortas y polidactilia de tipo I *Acta Med Cent.* 2015; 9(1):44-49.

28. Huber C, Wu S, Kim A, Sigaudy S, Sarukhanov A, Serre V et al. WDR34 Mutations that Cause Short-Rib Polydactyly Syndrome Type III/Severe Asphyxiating Thoracic Dysplasia Reveal a Role for the NF- $\kappa$ B Pathway in Cilia. *Am J Hum Genet.* 2013;93(5):926-931.
29. Sarimurat N, Elçioğlu N, Tekant G, Eliçevik M, Yeker D. Jeune's Asphyxiating Thoracic Dystrophy of the Newborn. *Eur J Pediatr Surg.* 1998;8(02):100-101.
30. Tuz K, Bachmann-Gagescu R, O'Day D, Hua K, Isabella C, Phelps I et al. Mutations in CSPP1 Cause Primary Cilia Abnormalities and Joubert Syndrome with or without Jeune Asphyxiating Thoracic Dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2014;94(1):62-72.
31. Ruiz-Perez, V.L., and Goodship, J.A. Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodistal dysostosis are caused by cilia-mediated diminished response to hedgehog ligands. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2009; 151C, 341-351.
32. Long, F., Chung, U.I., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H.M., and McMahon, A.P. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development.* 2004; 131, 1309-1318.
33. Pía Baldrini M, Giovo M, Bogado C. Síndrome orofaciocdigital tipo I. Expresión fenotípica variable. *Arch. argent. pediatr.* 2014;112(6):242-246.
34. Ferrante M, Giorgio G, Pluma S, Bulfone A, Wright V, Ghiani M et al. Identificación del gen para el síndrome oral-facial-digital de tipo I. *Am J Hum Genet.* 2001;68(3):569-576.
35. Beltrami G. Hereditary Multiple Exostoses: a review of clinical appearance and metabolic pattern. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism.* 2016;13(2):110-118.