



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

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

ESTUDIO CLÍNICO Y MOLECULAR
EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS
CON OSTEOGENESIS IMPERFECTA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN

GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A:

DR. FEDERICO OSORIO ANTONIO

PROFESOR TITULAR: Dr. en C. MARGARITA VALDÉS FLORES

ASESORES: Dr. en C. MARGARITA VALDÉS FLORES
Dr. en C. LEONORA CASAS ÁVILA



MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DRA. MATILDE L. ENRIQUEZ SANDOVAL
DIRECTORA DE ENSEÑANZA

DRA. XOCHIQUETZAL HERNÁNDEZ LÓPEZ
SUBDIRECTORA DE POSGRADO Y EDUCACIÓN CONTINUA

DR. LUIS GÓMEZ VELÁZQUEZ
JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA

Dr. en C. MARGARITA VALDÉS FLORES
PROFESOR TITULAR

Dr. en C. ANTONIO MIRANDA DUARTE
ASESOR CLÍNICO

Dr. en C. MARGARITA VALDES FLORES
Dr. en C. LEONORA CASAS ÁVILA
ASESORES METODOLÓGICOS

INDICE

	PAG.
I.- RESUMEN.....	5
II.- ANTECEDENTES.....	6
III.- JUSTIFICACION.....	28
IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
V.- OBJETIVO.....	29
VI.- MATERIALES Y METODOS.....	29
VII.- PROCEDIMIENTO.....	30
VIII.- RESULTADOS.....	35
IX.- DISCUSION.....	53
X.- CONCLUSIONES.....	55
XI.- ANEXOS.....	58
XII.- BIBLIOGRAFIA.....	63

RESUMEN

La osteogénesis imperfecta, es un trastorno generalizado del tejido conjuntivo ocasionado por alteraciones en la biosíntesis de colágena tipo 1, con una prevalencia mundial de aproximadamente 1 en 10 000 a 25 000 individuos, por su heterogeneidad clínica y genética se clasifica en 8 tipos.

Objetivo: Analizar los exones 8, 11, 15, 33/34 y 44 del gen COL1A1 en un grupo de pacientes mexicanos con OI, con el fin de detectar mutaciones en su secuencia

Materiales y Métodos: En este trabajo se estudiaron 31 pacientes, 12 del sexo femenino y 19 del sexo masculino, que incluyeron 3 casos familiares, a través de una encuesta dirigida para explorar los datos clínicos descritos en la literatura e identificar algunos que estén relacionados con la población mexicana, también se realizaron de estudios radiológicos con el mismo fin. Junto con el análisis clínico, se secuenciaron los exones 8, 11, 15, 33/34 y 44 del gen COL1A1, para identificar mutaciones en su secuencia.

Resultados: En este estudio se corroboraron los datos clínicos y radiológicos descritos en la literatura médica, hubo además asociación de defectos vertebrales con mayor prevalencia en la familia1, y deformidad humeral con engrosamiento de la cortical en todos los miembros de esta familia. En el análisis molecular, se encontró una inserción de una G al inicio del exón 44 en 17 pacientes.

Conclusiones: La variabilidad clínica del padecimiento fue algo característico en este trabajo, se encontró asociación de la OI con defectos vertebrales y deformidad humeral en la familia1, el hallazgo molecular es sin duda importante para otros estudios en población mexicana.

ANTECEDENTES

La osteogénesis imperfecta (OI), es un trastorno generalizado del tejido conjuntivo que involucra tejido óseo, piel, ligamentos, tendones, aponeurosis muscular, escleróticas y el órgano auditivo (2).

El antecedente más antiguo del padecimiento en la literatura médica data de alrededor de 1000 años a.c., en una momia de Egipto que reside en un museo Británico desde hace 60 años, quien presenta datos característicos del padecimiento. Desde el reconocimiento de esta entidad hasta la fecha, se han utilizado varios términos para definirla: Mollities oseum, fragilitas oseum, osteopsatyrosis idiopática, también se le ha llamado síndrome de Eddowes (fragilidad ósea y escleróticas azules), Síndrome de Van Der Hoeve (fragilidad ósea, escleróticas azules y sordera) y enfermedad de Vrolik (osteogénesis imperfecta congénita). Looser sugirió el término de osteogénesis imperfecta congénita y osteogénesis imperfecta tarda (2, 3).

La prevalencia de la OI en la población mundial es de 1:10, 000 a 25, 000 individuos, con algunas variaciones dependiendo del grupo étnico y del tipo de OI. Las características clínicas más comunes son: Historia familiar del padecimiento, fracturas sin traumatismo o con traumatismo mínimo en ausencia de trastornos metabólicos óseos. Talla baja o más baja del promedio familiar tomando como referencia a los miembros no afectados, con frecuencia está asociada a deformidades óseas, escleróticas azules, dentinogénesis imperfecta, hipoacusia progresiva post-puberal e hiperlaxitud articular. Las características radiológicas más sobresalientes son la presencia de fracturas con mayor frecuencia en huesos

largos, platispondilia, huesos wormianos, que no son patognomónicos del padecimiento, protrusión acetabular, y osteopenia que puede ser corroborado con densitometría ósea. El padecimiento es fenotípica y genotípicamente heterogéneo con variaciones en la presentación clínica incluso dentro de una misma familia. Ésta heterogeneidad clínica llevó a Sillence (1979), y colaboradores a realizar una clasificación en 4 tipos basada en la severidad y progresión del cuadro clínico, modo de herencia y hallazgos radiológicos, usada aún en la actualidad principalmente por los ortopedistas, actualmente la clasificación se ha extendido ya a 8 tipos con base en estudios de imagen más detallados, estudios histomorfométricos y análisis molecular (3, 4).

A pesar de que algunos datos clínicos están presentes en todos los tipos de OI, existen otros hallazgos específicos para cada una de las variedades clínicas, no obstante que el defecto molecular se localiza en el mismo gen el tipo de mutación establece la diferencia clínica. Como se puede observar en la tabla 1, para algunos tipos de OI aún no se ha elucidado el origen genético. La clasificación es útil y provee información importante para el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad, así como para el asesoramiento genético de las familias con este padecimiento. Además se muestra la clasificación actual, basada en la descrita previamente por Sillence et. al. (1979) incluyendo las nuevas variedades descritas en los últimos años, que muestra el modo de herencia y el locus asociado así como los datos clínicos más sobresalientes. Posteriormente se describirá cada tipo con los datos clínicos y radiológicos reportados en la literatura.

Tabla 1.- clasificación de la osteogénesis imperfecta (3, 4, 5, 6, 9,).

Tipo	Herencia	Gen y locus	Hallazgos clínicos e histológicos.	Hallazgos radiológicos
I	Autosómica Dominante	COL1A1 17q21.3-q22	Fracturas sin deformidad o muy leve, talla normal, sordera, dentinogénesis imperfecta.	Huesos wormianos, platispondilia, adelgazamiento de la cortical, osteopenia.
II	Autosómica Dominante	COL1A1 17q21.3-q22 COL1A2 7q22.1	letal en el periodo perinatal, múltiples fracturas <i>in utero</i> , deformidad esquelética severa,	Placas de calcificación en cráneo, platispondilia, deformidad severa, costillas pequeñas en rosario.
III	Autosómica Dominante	COL1A1 17q21.3-q22 COL1A2 7q22.1	Deformidad progresiva, talla baja, dentinogénesis imperfecta, escleróticas azules de tono variable, sordera.	Huesos wormianos, cifoescoliosis, y platispondilia, ensanchamiento metafisiario, adelgazamiento cortical, osteoporosis severa.
IV	Autosómica Dominante	COL1A1 17q21.3-q22 COL1A2 7q22.1	Escleróticas normales, deformidad leve a moderada con las fracturas, talla baja, dentinogénesis imperfecta, sordera.	Huesos wormianos, platispondilia, adelgazamiento cortical, protrusión acetabular
V	Autosómica Dominante	?	Similar a la tipo IV, calcificación de la membrana interósea del antebrazo.	Formación de callos hiperplásicos.
VI	Desconocida	?	Deformidad leve a moderada, compresión vertebral por fracturas, acumulación osteoide, laminación anormal en apariencia de escamas.	Similar a la tipo IV
VII	Autosómica Recesiva	CRTAP 3p22-p24.1	Deformidad esquelética y fragilidad ósea severa, acortamiento rizomélico de las 4 extremidades.	Acortamiento rizomélico
VIII	Autosómica Recesiva	LEPRE1 1p34	Forma severa/letal, deformidad esquelética y fragilidad ósea severa, talla baja y facies redonda.	Desmineralización esquelética severa, metáfisis bulbosas

OSTEOGÉNESIS IMPERFECTA TIPO I

Esta variedad es de severidad leve, los pacientes presentan talla normal o cercana a la normal. En el sistema musculoesquelético a nivel de cráneo se observan huesos wormianos a nivel de las suturas craneales; la fragilidad ósea no es evidente al nacimiento y las fracturas aparecen al inicio de la deambulación, se relacionan principalmente con las caídas, las cuales tienden a disminuir en forma importante en la adolescencia y es inusual durante la edad adulta, para incrementar nuevamente el índice en la postmenopausia en las mujeres y en el hombre después de la quinta década de la vida. Algunos pacientes presentan encurvamiento anterior o lateral de la tibia, el 5 % de los pacientes pueden presentar cifoescoliosis leve, la osteopenia es muy leve que puede pasar desapercibida, la hiperlaxitud articular puede contribuir a la morbilidad de los pacientes. Los datos oftalmológicos incluyen escleróticas azules que puede cambiar con la edad volviéndose grisáceas, el incremento en el tono azul se ha descrito en episodios de estrés o durante las fracturas. La piel se describe suave y delgada parecida a la piel de los ancianos, las cicatrices pueden ser amplias, las hemorragias subcutáneas pueden presentarse con traumatismos menores resultado de la fragilidad capilar. Puede existir compromiso audiológico caracterizado por hipoacusia progresiva que se presenta en el 50 % de los pacientes, inicialmente es conductiva en la segunda década de la vida y puede progresar a neurosensorial en el rango de alta frecuencia. Por otro lado también presentan dentinogénesis imperfecta que se caracteriza por dientes translúcidos de color café o púrpura, con desgaste del esmalte y caries dental, se ha sugerido

que la presencia o ausencia de la dentinogénesis imperfecta define una subclasificación fenotípica en los tipos I y IV, aunque puede estar presente en el 30 % de todos los tipos y puede predisponer a la caída prematura de piezas dentales (2, 3, 7, 8, 9).

OSTEOGENESIS IMPERFECTA TIPO II

La OI tipo 2, es la forma más severa de la enfermedad, y las anomalías características son evidentes al nacimiento, el peso y la talla son menores para la edad gestacional, el cráneo es grande para el tamaño del cuerpo y blando a la palpación debido a la desmineralización, el tórax es pequeño, los bordes costales presentan múltiples callos óseos resultado de la consolidación de fracturas costales, presentan deformidad de las extremidades como resultado de múltiples fracturas intrauterinas, se ha descrito además micromelia y las caderas se encuentran en posición de flexión y abducción semejando “la posición de rana”, las escleróticas son de color azul oscuro y el tejido conjuntivo es extremadamente frágil. Aunque algunos pacientes con OI tipo II mueren *in utero* o son espontáneamente abortados, algunos mueren en el período neonatal inmediato, aproximadamente el 60 % mueren en el primer día de vida el resto generalmente en la primera semana y es rara la sobrevivencia al año de vida, el fallecimiento ocurre generalmente por insuficiencia respiratoria debido problemas en la mecánica ventilatoria, relacionado con el tórax pequeño, fracturas costales, y tórax inestable, o por hemorragia intracraneal, compresión del tallo cerebral o medula espinal cervical, aquellos que sobreviven el primer día no ingieren

suficientes calorías debido al distress respiratorio. Los estudios histológicos óseos de los pacientes se describen con marcada disminución de colágena en el hueso trabecular y cortical, este ultimo muestra hiper celularidad con osteocitos gigantes, la región trabecular presenta gran cantidad de osteoblastos inmaduros (3, 4, 5, 9, 10).

OSTEOGENESIS IMPERFECTA TIPO III

Se considera la forma más severa pero compatible con la vida es deformante y progresiva. Los pacientes presentan fracturas en el período neonatal simplemente con sostenerlos, en algunos pacientes el número y la severidad de las fracturas costales conllevan a la muerte en las primeras semanas o meses de vida por falla pulmonar, la mayoría no logra la deambulaci3n sin apoyo y generalmente usan sillas de rueda debido a la morbilidad y severa fragilidad y deformidad 3sea, presentan talla baja marcada. Algunos tienen apariencia facial y dientes normales sin embargo otros presentan facies triangular y dentinog3nesis imperfecta, el cr3neo con fontanelas amplias y m3ltiples huesos wormianos particularmente en la parte posterior, algunos presentan macrocefalia relacionada con ventriculomegalia secundaria a la impresi3n basilar. Otra anormalidad de la uni3n craneovertebral es caracterizada por invaginaci3n de los m3rgenes del foramen mangnum hacia el cr3neo resultando en protrusi3n del proceso odontoides hacia el foramen que puede progresar a la compresi3n del tallo cerebral, causando hidrocefalia obstructiva o siringomielia debido al bloqueo mec3nico directo del flujo del liquido cefalorraquideo. Usualmente las escler3ticas son azules y se aclaran con la edad, mientras que la hipoacusia inicia

generalmente en la adolescencia. A nivel de columna generalmente presentan escoliosis marcada, la presión de los núcleos pulposos en el tejido óseo anormalmente blando de las vertebrae produce una configuración bicóncava en forma de reloj de arena o “codfish” en algunas ocasiones puede haber herniación de los núcleos pulposos, el tórax presenta una forma cónica característica. Los pacientes pueden presentar más de 200 fracturas y desarrollar pseudoartrosis, también presentan protrusión acetabular en ocasiones severa que da a la pelvis una configuración en “copa de vino”, los estudios radiológicos muestran corticales y diáfisis delgadas con ensanchamiento de la región epifisiaria, con los años los huesos largos se vuelven densos. Una marcada hiperlaxitud puede observarse principalmente en la articulación metacarpofalángica e interfalángica así como fragilidad capilar.(2, 3, 7, 9 10).

OSTEOGENESIS IMPERFECTA TIPO IV

Es la forma de OI con más variabilidad clínica, con afectación leve a moderada, en la clasificación de Sillence eran considerados a todos aquellos que no cumplían criterios para los tipos I-III, la facies es usualmente triangular, la frente es amplia y abombada, con ensanchamiento temporal, cursan con platibasia y abombamiento occipital que le da una forma característica al cráneo, las escleróticas al nacimiento son azules sin embargo, se aclaran con la edad, la dentinogénesis imperfecta es común en este tipo definiendo como en la tipo I una subclasificación, IVA sin dentinogénesis y IVB con dentinogénesis. Algunos pacientes presentan hipoacusia conductiva progresiva de inicio en la edad adulta

que con el tiempo puede evolucionar a neurosensorial o mixta; la aparición de las fracturas generalmente inicia en la etapa prenatal por lo que es usual la deformidad de huesos largos al nacimiento. La talla es variable, al nacimiento está por debajo del percentil 10 en el 40 % de los afectados, mientras que en la edad adulta en el 95 % está por debajo del percentil 3, los pacientes que cursan con las formas leves pueden deambular en forma independiente sin embargo muchos requieren de silla de ruedas debido a las múltiples deformidades (2, 3, 6-8, 10).

OSTEOGENESIS IMPERFECTA TIPO V

En el año 2000, Glorieux y cols., describieron 7 pacientes con datos clínicos de esta forma de OI, sin embargo, estos pacientes presentaban otras características que no se había descrito en los pacientes con OI tipo IV, por lo que sugirieron que este tipo de OI se clasificara en tipo V, a partir de entonces se han publicado varios trabajos de pacientes con características similares. Esta variedad es moderadamente deformante con una fragilidad ósea de moderada a severa, el peso y la talla al nacimiento son normales para la edad gestacional, no hay cambios en la coloración de las escleróticas, ni dentinogénesis imperfecta, la hiperlaxitud ligamentaria y la fragilidad capilar es similar a los pacientes con OI tipo IV. Existe limitación para la pronosupinación del antebrazo, en los estudios radiológicos se observa formación de callos hiperplásicos en los sitios de fractura, osificación de la membrana interósea radiocubital, luxación de la cabeza radial, una banda densa adyacente a las placas de crecimiento, principalmente en radio, fémur y tibia. Se presenta compromiso de la columna vertebral en todos los

pacientes y se observan huesos wormianos en las suturas craneales, los niveles séricos de fosfatasa alcalina durante la formación del callo óseo puede ser elevado. En el estudio histológico de las lesiones se ha reportado una matriz ósea laminar desorganizada en apariencia de red, en el estudio molecular no se han descrito mutaciones en los genes COL1A1 y COL1A2, pero se han reportado polimorfismos comunes en la población general (7, 8, 11-13).

OSTEOGENESIS IMPERFECTA TIPO VI

En el 2002, Glorieux y cols. describieron otro grupo de 8 pacientes con datos clínicos e histológicos comunes entre ellos y diferentes a los tipos previamente descritos. Los pacientes presentan deformidad esquelética de moderada a severa, el peso y talla son normales para la edad gestacional, y el número de fracturas es más frecuente que en los pacientes con OI tipo IV, no se han descrito fracturas perinatales, dentinogénesis imperfecta o cambios en las escleróticas, la hiperlaxitud ligamentaria es común en estos pacientes. En estos casos los niveles séricos de fosfatasa alcalina están elevados, no se han descrito huesos wormianos en los estudios radiológicos, los pacientes muestran además fracturas y compresiones vertebrales ocasionando diferentes grados de escoliosis. Algunos pacientes presentan coxa vara y protrusión acetabular, así como metáfisis bulbosas. El estudio histológico mostró pérdida de la orientación laminar dando una imagen en apariencia de escamas y acumulación osteoide excesiva que sugiere defectos de mineralización. El análisis molecular no ha

mostrado mutaciones en los genes COL1A1 y COL1A2, a este nuevo grupo de pacientes se les ha clasificado en un grupo aparte como OI tipo VI (3, 7, 8, 14).

OSTEOGENESIS IMPERFECTA TIPO VII

Los pacientes afectados con esta variedad presentan moderada a severa deformidad esquelética, L.M. Ward y cols. describieron 8 miembros afectados de una familia en Quebec Canadá con antecedentes de consanguinidad, por lo que se considera que la OI tipo VII es de herencia autosómica recesiva, todos los pacientes nacieron de término con peso y talla adecuados para la edad gestacional, al nacimiento presentaron múltiples fracturas cuya frecuencia disminuyó después de la pubertad, el resultado de las fracturas fueron deformidades esqueléticas importantes, la mayoría deambulaba sin asistencia no así un adulto que requirió silla de ruedas, no se presentaron alteraciones dentales, oculares, dermatológicas, ni datos de hiperlaxitud. Los estudios radiológicos mostraron acortamiento rizomélico de las 4 extremidades; la presencia de escoliosis y compresión vertebral fue variable, en el cráneo no se reportaron huesos wormianos, no hubo anomalías del metabolismo óseo. En estos casos no se han encontrado mutaciones en los genes COL1A1 y COL1A2, y el fenotipo se ha asociado al locus 3p22-p24.1 sitio donde mapea el gen CRTAP que codifica la proteína asociada a cartílago, cofactor importante en la modificación postraducciona l de la colágena formando complejo con la proteína prolil-3-hidroxilasa 1(3, 4, 7, 8).

OSTEOGENESIS IMPERFECTA TIPO VIII

En el año 2007 Cabral y cols. describieron 5 pacientes que presentaban datos clínicos severos de OI que se asemejan a los tipo II/III de la clasificación de Sillence, los pacientes presentaron el cráneo con fontanelas amplias, con facies redondeada, escleróticas blancas, tórax en tonel o forma de “barril”, múltiples fracturas al nacimiento, osteopenia severa, acortamiento de huesos largos, metáfisis bulbosas y aparente desorganización de la matriz ósea; las manos son relativamente grandes en comparación con el antebrazo. En dos pacientes se reportó compresión vertebral secundaria a fractura, todos mostraron densidad mineral ósea disminuida, 4 de los pacientes refirieron descendencia Africana y Pakistani (5).

En ellos se descartaron mutaciones en los genes de la colágena tipo 1, sin embargo al realizar análisis en el gen *LEPRE1* el cual mapea en 1p34, se encontraron mutaciones en ambos alelos en todos los pacientes; el gen codifica la proteína prolil-3-hidroxilasa 1 que hidroxila una sola prolina en la posición 986 de la cadena alfa 1 de la colágena y forma un complejo con la proteína CRATP (proteína asociada a cartílago) así como con la ciclofilina B. Los autores sugirieron que este tipo de osteogénesis imperfecta sea clasificada como osteogénesis imperfecta tipo VIII (5,7).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la osteogénesis imperfecta se basa en los hallazgos clínicos y radiológicos ya descritos, se puede apoyar en estudios histológicos así como análisis de colágena tipo 1 en cultivo de fibroblastos de la piel obtenido por biopsia. En limitadas ocasiones se puede realizar el estudio molecular para confirmación diagnóstica o para diagnóstico prenatal, no obstante el uso clínico de estos últimos estudios es limitado.

El diagnóstico diferencial debe realizarse en el período prenatal con hipofosfatemia, displasia tanatofórica, displasia campomélica, y acondrogénesis, en la infancia y adolescencia con síndrome de Bruck, síndrome de osteoporosis-pseudoglioma, síndrome de Cole Carpenter, síndrome de Hadju-Cheney, gerodermia osteodisplásica, osteoporosis idiopática juvenil, dentinogénesis imperfecta y abuso infantil, y aunque algunos datos clínicos se sobrelapan la presencia de otros datos clínicos o el mecanismo molecular diferencian estas enfermedades de la osteogénesis imperfecta (3, 6, 15).

TRATAMIENTO

El manejo de la osteogénesis imperfecta debe ser multidisciplinario, en un centro hospitalario con experiencia en el manejo de este tipo de pacientes, incluyendo ortopedistas, fisioterapeutas, médicos rehabilitadores así como genetistas; con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes optimizando entre otras cosas la movilidad, independencia para las actividades de

la vida diaria y su integración a la sociedad. Actualmente no existe un tratamiento curativo, sin embargo desde hace varios años se ha hecho uso de medicamentos como los bifosfonatos, que son análogos del pirofosfato e inhibidores endógenos de la resorción ósea, que reportan resultados favorables para algunos pacientes, sobre todo disminuyendo el índice de fracturas y el dolor que experimentan los pacientes. En ocasiones es necesaria la corrección quirúrgica de las deformidades. Otros estudios realizados se enfocan al tratamiento con hormona de crecimiento, hormona paratiroidea y trasplante de medula ósea, empero los resultados son poco sustentables. En la actualidad se investigan algunos procedimientos de terapia génica que se encuentran aún en fases preclínicas de investigación (3, 5, 6).

ASPECTOS GENETICOS

En más del 90 % de los pacientes con osteogénesis imperfecta tipo I al IV el trastorno es causado por una mutación autosómica dominante en los genes COL1A1 y COL1A2, que codifican para las cadenas alfa1 y alfa 2 de la colágena tipo 1(3, 6, 11). Para los tipos V y VI no se ha identificado ningún gen relacionado, para la tipo VII se ha identificado un locus relacionado en 3p22-p24.1 y para la tipo VIII se han encontrado mutaciones en el gen LEPRE1 localizado en 1p34 (5, 7).

La colágena tipo 1 es sintetizada como un precursor soluble; procolágena 1, un heterotrímero compuesto por 2 cadenas proalfa 1 y una de proalfa 2, codificadas por los genes COL1A1 y COL1A2 que mapean en 17q21.3-q22 y 7q22.1 respectivamente ambas cadenas son similares en estructura, tienen 52

exones ambos transcriben un mRNA de longitud similar, tienen un dominio central triple hélice codificado por 43 exones y un total de 1014 aminoácidos en donde la glicina se encuentra en cada tercera posición formando un triplete repetido en su mayoría de glicina-prolina-hidroxiprolina (Gly-X-Y), este dominio es flanqueado por los propéptidos amino y carboxilo terminal ⁽¹⁸⁾, (figura 1, 2, 3 y 4).

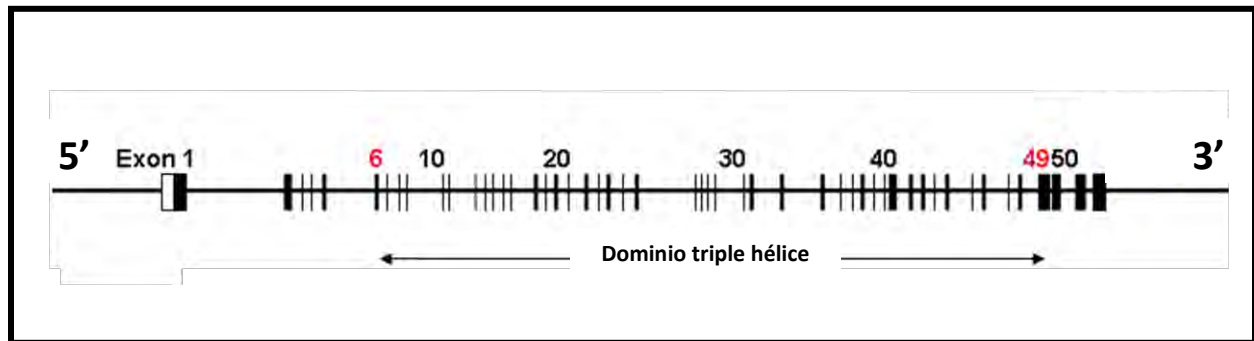


Figura 1.- Estructura del gen COL1A1, mapeado en 17q21.3-q22, se expande 24.544 kb, contiene 52 exones, transcribe un mRNA de 5.927 kb y codifica la cadena proalfa 1 de la colágena tipo 1, una proteína de 1464 aa. Los exones 6 y 49 flanquean el dominio triple hélice ⁽²¹⁻²⁴⁾.

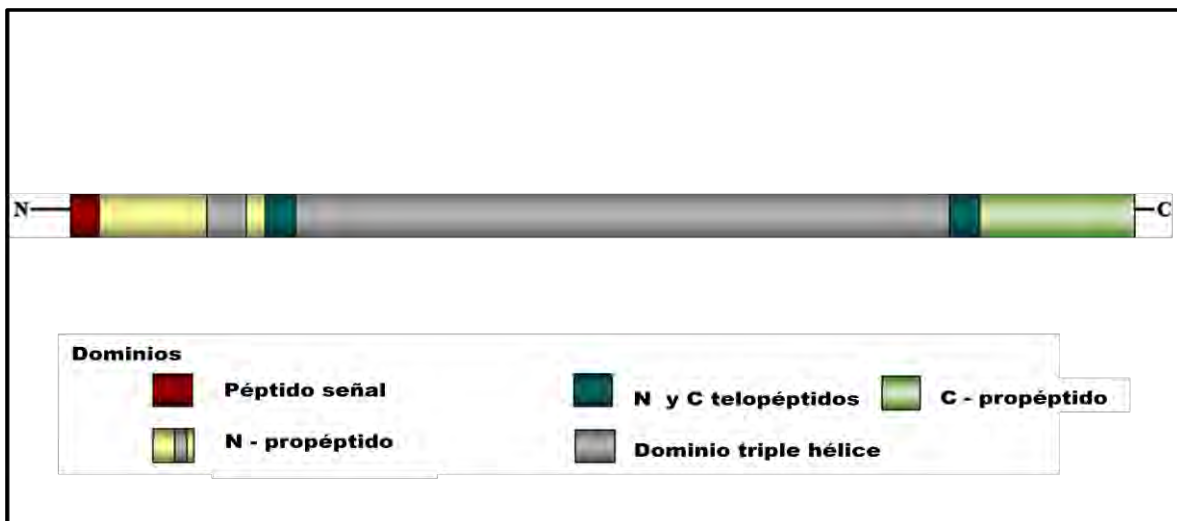


Figura 2.- estructura de la cadena alfa 1, de la colágena tipo1, donde se muestran los diferentes dominios ^(21- 25).

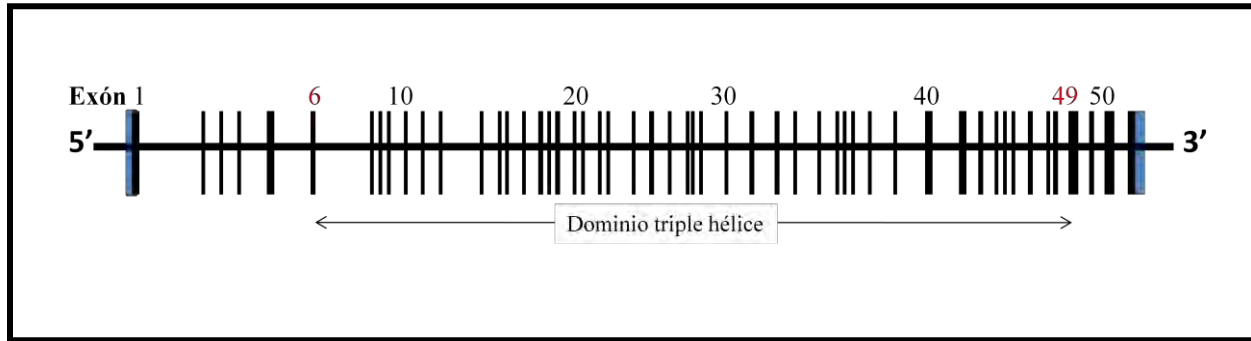


Figura 3.- Estructura del gen COL1A2, mapeado en 7q22.1, se expande 43.672 kb, contiene 52 exones, transcribe un mRNA de 5.411 kb y codifica la cadena proalfa 2 de la colágena tipo 1, una proteína de 1366 aa. Los exones 6 y 49 flanquean el dominio triple hélice (21-24, 34.).

Durante la síntesis de la cadena y formación de la hélice, algunos residuos de prolina y lisina de la posición Y son hidroxilados y algunos residuos de lisina pueden ser subsecuentemente glucosilados. La glicina con su hidrógeno dentro de la cadena es esencial en cada tercera posición, debido a que es el único residuo lo suficientemente pequeño para ser acomodado dentro de la hélice, los residuos que sustituyen a la glicina alteran el ensamblaje de ésta y la exposición de las tres cadenas ocasiona la hidroxilación y glucosilación excesiva (20, 26.).

Una vez ensamblada en el retículo endoplásmico rugoso, la molécula de procolágena madura es transportada al complejo de Golgi, empacada y transportada en vesículas donde ocurre agregación lateral como primera fase de formación de fibrillas, los agregados son entonces secretados en el espacio pericelular, posteriormente propeptidasas específicas separan los propéptidos amino y carboxilo terminal en el espacio pericelular y finalmente las moléculas de colágeno maduras se ensamblan entre sí para formar fibrillas unidas en forma escalonada con una separación aproximada de un cuarto de su longitud mediante

enlaces covalentes cruzados, éste escalonamiento produce un efecto estriado que se puede observar con el microscopio electrónico, el ensamblaje de esta fibrillas forma fibras de colágena que posteriormente se ensamblarán con otras proteínas de la matriz extracelular (18), (figura 4).

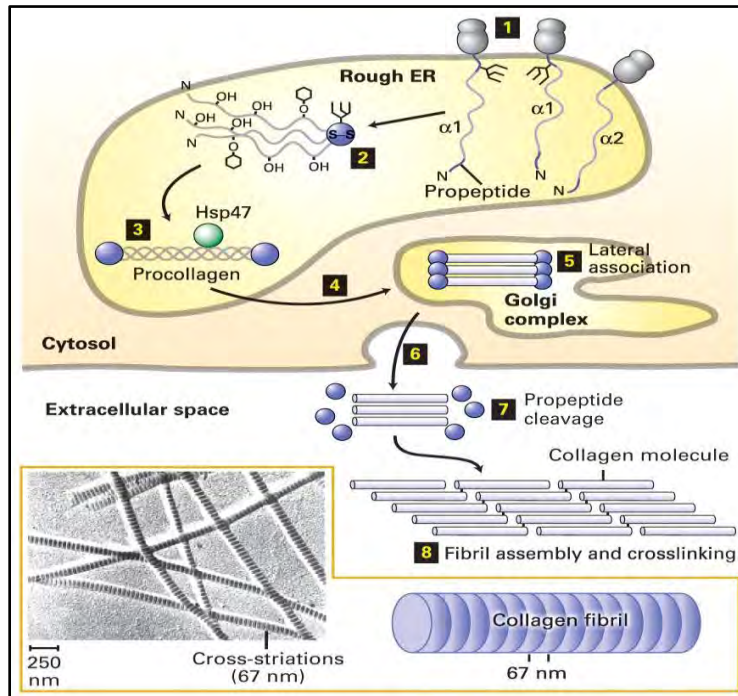


Figura 4.- Síntesis de la colágena: 1) síntesis ribosomal, 2) asociación de los propéptidos para formar trímeros, 3) estabilización de las triples hélices, 4, 5) transporte al complejo de golgi y asociación lateral para formar haces, 6) eliminación de propéptidos N y C terminal, 7) ensamblaje de trímeros para formar fibrillas, 8) ensamblaje y entrecruzamiento de fibrillas para formar fibras de colágena (27, 30).

Existen en general dos clases de mutaciones en la colágena tipo 1 que resultan en osteogénesis imperfecta. Las que causan un defecto cuantitativo con síntesis de colágena tipo 1 estructuralmente normal pero disminuyendo la

cantidad de colágena aproximadamente a la mitad. Y las que resultan en la síntesis de moléculas de colágena con anomalías estructurales. La primera clase de mutaciones usualmente originan codones de terminación prematura en la secuencia codificante de un alelo del gen COL1A1, ocasionando así una deficiencia en la cantidad de colágeno en la matriz extracelular y como consecuencia un fenotipo leve de OI. Generalmente, se deben a deleciones, inserciones y duplicaciones en el dominio triple hélice o mutaciones a nivel de los propéptidos amino y carboxilo terminal (3, 18).

En la segunda clase de mutaciones se presentan cambios en la secuencia del gen en el dominio triple hélice que modifican secundariamente la secuencia de aminoácidos en la proteína y resultan en un rango fenotípico que va de formas letales a moderadas o leves. De éstas, las más comunes son las que resultan en sustituciones de cualquiera de los aminoácidos, principalmente residuos de glicina por otro aminoácido en el dominio triple hélice de las 2 cadenas de la colágena tipo 1. También es común encontrar mutaciones en los sitios de splicing de los exones que codifican el dominio triple hélice, éstas pueden provocar un salto de exón, inclusión de intrones o activar sitios críticos de intrones o exones (3, 18).

Los cambios estructurales de la colágena tipo 1, resultan en una proteína anormal que es secretado de la célula a la matriz extracelular, donde puede interferir con la fibrilogénesis, con las interacciones colágena-matriz, colágena-célula o con la mineralización mediante un mecanismo dominante negativo (3, 18, 19).

La base de datos actual (08 de julio 2009) de las mutaciones en los genes de la colágena tipo 1; COL1A1 y COL1A2, muestra un total 857 mutaciones para el primero y 493 mutaciones para el segundo gen, de los cuales 725 (84.59%) son sustituciones en COL1A1, y 455 (92.9%) son sustituciones en COL1A2, el resto son deleciones, duplicaciones, e inserciones que se distribuyen según las tablas 2 y 3 dependiendo si se encuentran en regiones codificantes o no codificantes (18, 22, 28-31).

Tabla 2.- Distribución de mutaciones en COL1A1, según secuencias codificantes o no codificantes (18, 22, 28, 29, 31).

Tipo de mutación	Región codificante	No codificante	Total
Substituciones	591	134	725
Deleciones	78	16	94
Duplicaciones	22	1	23
Inserciones	8		8
Inser/dupl.	3	4	7

Tabla 3.- distribución de mutaciones en COL1A2, según secuencias codificantes o no codificantes (18, 22, 28, 29, 31).

Tipo de mutación	Región codificante	No codificante	Total
Substituciones	387	68	455
Deleciones	12	13	25
Duplicaciones	8		8
Inser/dupl	4		4
2 var. En un alelo	1		1

Es importante mencionar que existe un incremento en el número de mutaciones reportadas en la base de datos actual, comparado con la revisión de la misma en el 2007, en donde se reportaba un total de 832 mutaciones para ambos genes, actualmente con un total de 1,218 mutaciones el incremento es de aproximadamente un 30 %. La distribución de estas mutaciones por exones en ambos genes se muestra en las tablas 4, 5 y en las figuras 5 y 6, donde se puede observar sitios de exones mayormente afectados o *hot spots*, principalmente en el dominio triple hélice de COL1A1 y COL1A2 (18, 22, 28, 29, 31).

Tabla 4.- Distribución de mutaciones en el gen COL1A1 por exones, con rojo se muestran los exones más frecuentemente afectados (18, 22, 28, 29, 31).

Numero de exón	No. de mutaciones en el exón	%	No de mutaciones en el intrón	%
1	3	0.35	2	0.23
2	4	0.47		
3	1	0.12	2	0.23
5	12	1.40	4	0.47
6	3	0.35		
7	7	0.82	3	0.35
8	23	2.68	4	0.47
9	8	0.93	9	1.05
10	3	0.35		
11	29	3.38	3	0.35
12	12	1.40	5	0.58
13	5	0.58	1	0.12
14	11	1.28	7	0.82
15	18	2.10	3	0.35
16	5	0.58	6	0.70
17	30	3.50	6	0.70
18	13	1.52	5	0.58
19	25	2.91	6	0.7
20	1	0.12		
21	26	3.03	1	0.12
22	4	0.47	4	0.47
23	19	2.21	4	0.47
24	6	0.70	1	0.12
25	25	2.91	3	0.35
26	14	1.63	13	1.52
27	5	0.58	7	0.82
28	14	1.63	1	0.12
29	6	0.70	5	0.58
30	2	0.23	1	0.12
31	25	2.91	5	0.58
32	20	2.33	1	0.12
33/34	30	3.50		
35	9	1.05		
36	9	1.05	7	0.82
37	36	4.20	2	0.23
38	22	2.56		
39	9	1.05	2	0.23
40	10	1.17	2	0.23
41	10	1.17	1	0.12
42	20	2.33	3	0.35
43	19	2.21	1	0.12
44	40	4.66	4	0.47
45	18	2.10	1	0.12
46	12	1.40	1	0.12
47	10	1.17	6	0.7
48	26	3.03	3	0.35
49	24	2.8		
50	9	1.05		
51	7	0.82		
52	8	0.93		

Tabla 5.- Distribución de mutaciones en el gen COL1A2 por exones, con rojo se muestran los exones más frecuentemente afectados (18, 22, 28, 29, 31).

Numero de exón	No. de mutaciones en el exón	%	No de mutaciones en el intrón	%
1			1	0.2
3	1	0.2		
5			5	1.01
6	3	0.61	13	2.64
7	1	0.2		
8	2	0.41		
9	2	0.41	6	1.22
10			1	0.20
11	2	0.41	1	0.20
12	6	1.22	5	1.01
13	8	1.62	1	0.20
14	1	0.20	4	0.81
15	1	0.2	2	0.41
16	7	1.42	4	0.81
17	24	4.87		
18	4	0.81		
19	64	12.98	3	0.61
20	8	1.62		
21	15	3.04	4	0.81
22	3	0.61		
23	9	1.83		
24	15	3.04	2	0.41
25	10	2.03	2	0.41
26	6	1.22	1	0.20
27	8	1.62	1	0.20
28	7	1.42		
29	4	0.81	1	0.20
30	1	0.20	1	0.20
31	12	2.43		
32	9	1.83	3	0.61
33	6	1.22	3	0.61
34	7	1.42		
35	5	1.01	1	0.20
36	10	2.03	2	0.41
37	16	3.25	2	0.41
38	11	2.23		
39	12	2.43		
40	12	2.43	2	0.41
41	5	1.01	2	0.42
42	8	1.62		
43	1	1.02	4	0.81
44	16	3.25	1	0.2
45	9	1.83		
46	24	4.87	2	0.41
47	5	1.01	1	0.20
48	8	1.62		
49	17	3.45		
50	3	0.61		
51	2	0.41		
52	2	0.41		

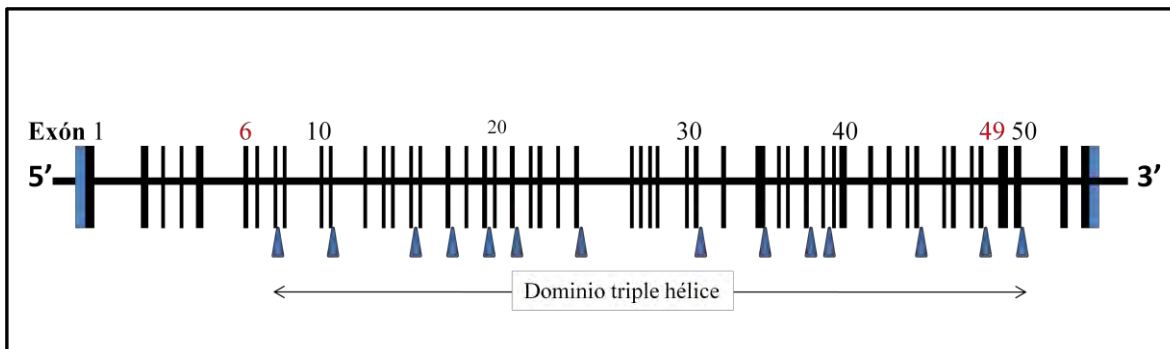


Figura 5.- Hot spots en el dominio triple hélice de COL1A1, como se muestra con las flechas afecta los exones 8, 11, 15, 17, 19, 21, 25, 31, 33/34, 37, 38, 44, 48 y 49 (18, 22, 28, 29, 31).

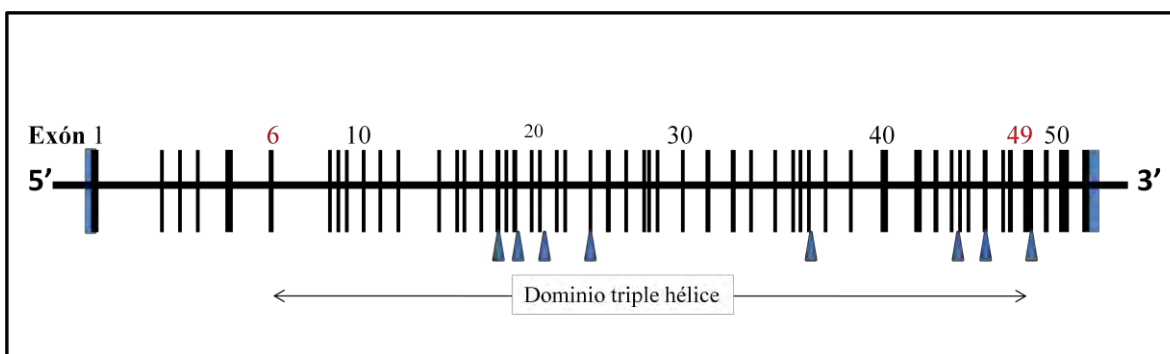


Figura 6.- Hot spots en el dominio triple hélice de COL1A2, como se muestra con las flechas, afecta los exones 17, 19, 21, 24, 37, 44, 46 y 49 (18, 22, 28, 29, 31).

Del total de mutaciones reportadas 84.59 % son mutaciones puntuales en COL1A1 y 92.9 % en COL1A2, localizadas con mayor frecuencia en el dominio triple hélice de ambas cadenas alfa. Éstas generalmente cambian el primero o segundo nucleótido de los codones para los aminoácidos con mayor frecuencia para los de glicina, todos estos datos han sido estudiados en diferentes poblaciones como Europeas, Asiáticas y de Estados Unidos (6, 30).

JUSTIFICACION

La osteogénesis imperfecta es un trastorno genético que compromete la calidad de vida de los pacientes convirtiéndose en discapacitante para la mayoría de ellos y letal para otros. En México no existen datos acerca de la prevalencia y/o incidencia de este padecimiento, y el espectro mutacional no ha sido abordado. Tan solo en la base de datos del Instituto Nacional de Rehabilitación existen más de 100 pacientes con este diagnóstico; esta investigación permitirá el abordaje molecular de esta entidad y permitirá explorar la distribución de las mutaciones en un grupo de pacientes, esto permitirá detectar incluso mutaciones no reportadas en las regiones analizadas en el gen COL1A1. Esto facilitará proporcionar un asesoramiento genético más completo y realizar en un futuro, diagnóstico prenatal con base en los datos que se obtengan en cada familia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La OI es una de las displasias óseas más comunes, se trata de una entidad con marcada heterogeneidad clínica y genética, en México no existen estudios encaminados a explorar el componente molecular de nuestra población.

PROBLEMA

Analizar los exones, 8, 11, 15, 33/34 y 44 del gen COL1A1 en un grupo de pacientes mexicanos con osteogénesis imperfecta.

HIPOTESIS

Por tratarse de una investigación descriptiva no requiere hipótesis

OBJETIVO

Analizar los exones 8, 11, 15, 33/34 y 44 del gen COL1A1 en un grupo de pacientes mexicanos con OI, con el fin de detectar mutaciones en su secuencia.

MATERIAL Y METODOS

Diseño

Investigación clínica transversal, descriptiva y observacional.

Población

Se incluyeron en el estudio a 31 pacientes con diagnóstico clínico y radiológico de osteogénesis imperfecta.

Criterios de inclusión

- 1.- Sexo Masculino o femenino.
- 2.- De cualquier edad.
- 3.- Diagnóstico clínico de osteogénesis imperfecta.
- 4.- Pacientes que aceptaron y firmaron consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- 1.- Pacientes con OI tipo V al VIII.

Criterios de eliminación

- 1.- muestra de DNA insuficiente o inadecuada para el análisis.

PROCEDIMIENTO

Análisis clínico

Durante la consulta de la clínica de displasias óseas, fueron captados pacientes que presentaban datos clínicos de osteogénesis imperfecta, previa explicación sobre el estudio a realizar y la firma de consentimiento informado (anexo 1), se les realizó una historia clínica dirigida, de acuerdo a la hoja de recolección de datos establecido previamente (anexo 2). Posteriormente, se solicitaron estudios radiológicos de cráneo, columna cervical, dorsal y lumbosacra, brazos, antebrazos, muslos y piernas todos con proyecciones anteroposterior y lateral; una vez realizados, se contó con el apoyo del departamento de interpretación imagenológica del servicio de rayos X en el INR para su análisis. Ya obtenidos los datos clínicos y radiológicos y utilizando los criterios de Sillence, a cada paciente se le asignó una clasificación del I al IV.

Análisis molecular

Purificación de DNA

Previa firma del consentimiento informado, se procedió a la venopunción para obtener 3 ml de sangre periférica en un tubo con EDTA. Se extrajo DNA de linfocitos de sangre periférica con método salino sin solventes orgánicos, bajo el siguiente procedimiento:

- A 300 *ul* de sangre total se agregaron 900 *ul* de solución de lisis de eritrocitos, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente, homogeneizando durante la incubación.
- Se centrifugó 20 segundos a 14,000 rpm, para después eliminar el sobrenadante, hasta dejar solo el pellet.
- Se agitó en el vortex por 10 segundos para resuspender el pellet con la solución restante.
- Se agregaron 600 *ul* de solución de lisis de leucocitos, resuspendiendo con micropipeta.
- Se agregaron 200*ul* de solución para precipitación de proteínas, agitando en el vortex por 20 segundos.
- Se centrifugó por 2 minutos a 14,000 rpm obteniéndose el sobrenadante con el DNA.
- Se vertió el sobrenadante en un tubo limpio. Para precipitar el DNA se agregaron 600 *ul* de isopropanol al 100 %, se centrifugó a 14,000 rpm por 40 segundos, se decantó el isopropanol dejando solo el pellet de DNA.
- Se agregaron 1000 *ul* de etanol al 70 %, para lavar sales, se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos, se decantó para eliminar exceso de etanol y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se agregaron 200 *ul* de H₂O para hidratación de DNA, se cuantificó en un espectrofotómetro (A_{260})y se determinaron los niveles de pureza mediante la relación A_{260}/A_{280} .

Fragmento de pcr

Las regiones de interés del gen COL1A1 (exón 8, 11, 15, 33/34 y 44) fueron amplificadas por técnica de PCR, usando los oligonucleótidos publicados por Jarmo Korkko et. al. 1997 (cuadro 6 (8)), en las siguientes condiciones:

- Volumen total 10 *ul*.
- Buffer PCR 10X 1 *ul*
- DNTPs (2mM) 1 *ul*
- MgCl (25mM) 0.6 *ul*
- Primer F (10 *uM*) 1 *ul*
- Primer R (10 1 *ul*
- Taq DNA pol. (5 *u/ul*) 0.2 *ul*
- DNA 1.5 *ul* (200 ng)
- H₂O 3.7 *ul*

Programa en el termociclador:

95°- 10 min iniciales y por 35 ciclos, 95°- 40 seg., 65°- 30 seg. y 72°- 50 seg.; finalmente a 72 ° - 7 minutos.

Cuadro 6.- Primers de exones 8, 11, 15, 33/34 y 44.

GEN	EXON	PRIMER 5'---3'	Tm °c
COL1A1	8	OIA1E8-F : TGGAGGGAAGACTGGGATGAG	66°C
COL1A1	8	OIA1E8-R : AAGACCCAGGCCTGGGAGTTCTTCT	76°C
COL1A1	11	OIA1E11-F: CTGAACCTGGGCTTCACTGCAC	66°C
COL1A1	11	OIA1E11-R: GATGTCCACTCTCTGGCCCTTG	70°C
COL1A1	15	OIA1E15-F: GATCCCTGAGCTCTGGAAGGGGCTC	78°C
COL1A1	15	OIA1E15-R: GAGATGGCAGCTGCAAGTCAC	66°C
COL1A1	33/34	OIA1E33/34-F: CCTCTCAGGAAACCCAGACACAAGCA	80°C
COL1A1	33/34	OIA1E33/34-R: GTTCCCAGGTTGACAGCTCAG	66°C
COL1A1	44	OIA1E44-F: GCAACACTCCATGACCACAGC	66°C
COL1A1	44	OIA1E44-R: CCTGCCTGGGTGAAGTCCGAC	70°C

La obtención del fragmento esperado fue confirmado por electroforesis en gel de agarosa al 2 %, durante 30 minutos a 85 voltios. El fragmento fue precipitado con isopropanol para eliminar DNTPs no incorporados.

PCR de secuencia

La PCR de secuencia se realizó nuevamente utilizando de 3 a 10 ng. de fragmento de PCR en las siguientes condiciones:

- volumen total (10 *ul*)
- Big Dye Terminator 1 *ul*
- Buffer de secuencia 5 X 1 *ul*
- Primer (1 *uM*) 0.8 *ul*
- DNA 2 ng/*ul*
- H₂O C.b.p. 10 *ul*

Programa en el termociclador:

96°-10 segundos iniciales y 25 ciclos a 50°- 05 segundos y 60°- 4 minutos, finalmente 4° - 7 minutos.

La PCR de secuencia se limpió por precipitación con isopropanol y se resuspendió en 14 *ul* de formamida para desnaturalizarse a 94° por 7 minutos y posteriormente se corrió electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

RESULTADOS

Resultados del análisis clínico

En el estudio clínico se incluyeron 31 pacientes (anexo 3), de los cuales 12 (38.70%), fueron del sexo femenino y 19 (61.30 %) del sexo masculino, con rangos de 11 meses a 52 años de edad, según el lugar de origen 14 fueron del distrito federal, 10 del estado de México, 6 de Puebla y 1 de Querétaro.

Con base en la clasificación de Sillence, 23 pacientes (74.19 %), tuvieron OI tipo I, 3 pacientes (9.67 %) OI tipo III y 5 pacientes (16.12 %) tuvieron OI tipo IV. Los pacientes 1-6, 7-9 y 10-11, fueron casos familiares; en los pacientes 13, 14 y 15, se refirieron antecedentes familiares del padecimiento sin embargo no se pudieron documentar los datos. En las figuras 7, 8 y 9, se muestran los árboles genealógicos de las primeras 3 familias, donde se muestra claramente la transmisión vertical clásica de la herencia autosómica dominante.

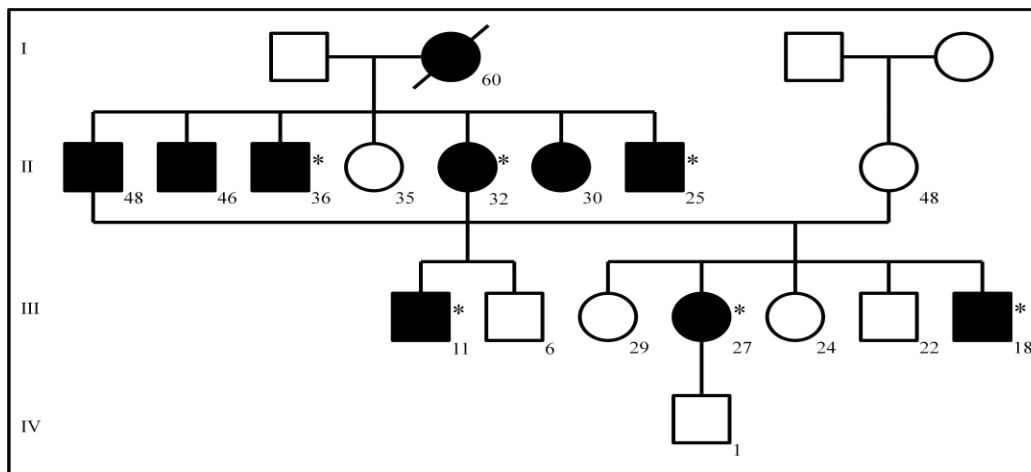


Figura 7.- Árbol genealógico de la familia 1, con asterisco se señalan a los pacientes incluidos en el estudio, los otros miembros no estuvieron disponibles.

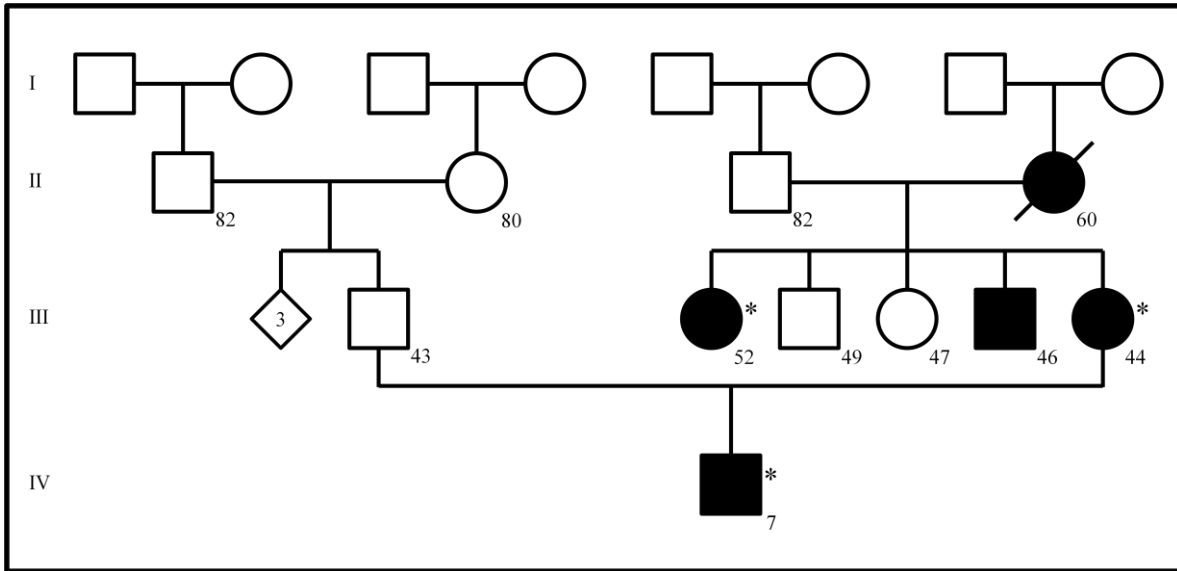


Figura 8.- Árbol genealógico de la familia 2, donde se muestran 5 individuos afectados, solo 3 miembros se incluyeron en este estudio, señalados con asterisco.

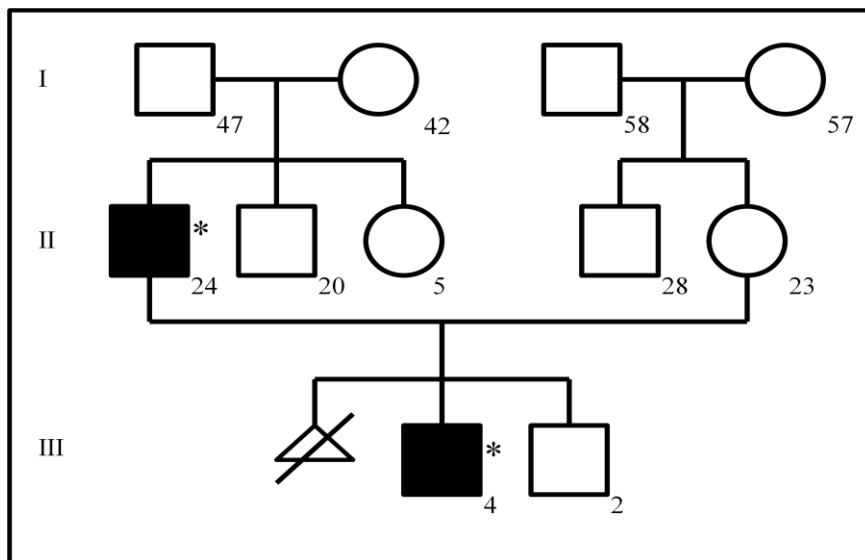


Figura 9.- Árbol genealógico de la familia 3, donde se muestra mutación de *novo* en el padre del paciente III-1.

En relación a la edad de inicio de las fracturas, el paciente 18 con OI tipo III presentó fractura femoral *in utero*, diagnosticado por medio ultrasonográfico, mientras que los pacientes 19 y 27 iniciaron con las fracturas hasta los 8 meses de edad, el paciente 13 con OI tipo IV también se reportó fractura *in utero*, los otros tres pacientes, 12, 16, y 17 con OI tipo IV el inicio de las fracturas fue entre uno y tres años, para los pacientes con tipo 1 la edad de inicio de las fracturas fue muy variable, desde los 5 meses hasta los 31 años. El numero de fracturas en cada paciente fue también muy variable (figura 10), 2 pacientes de la familia 1 no han presentado fracturas hasta la fecha.

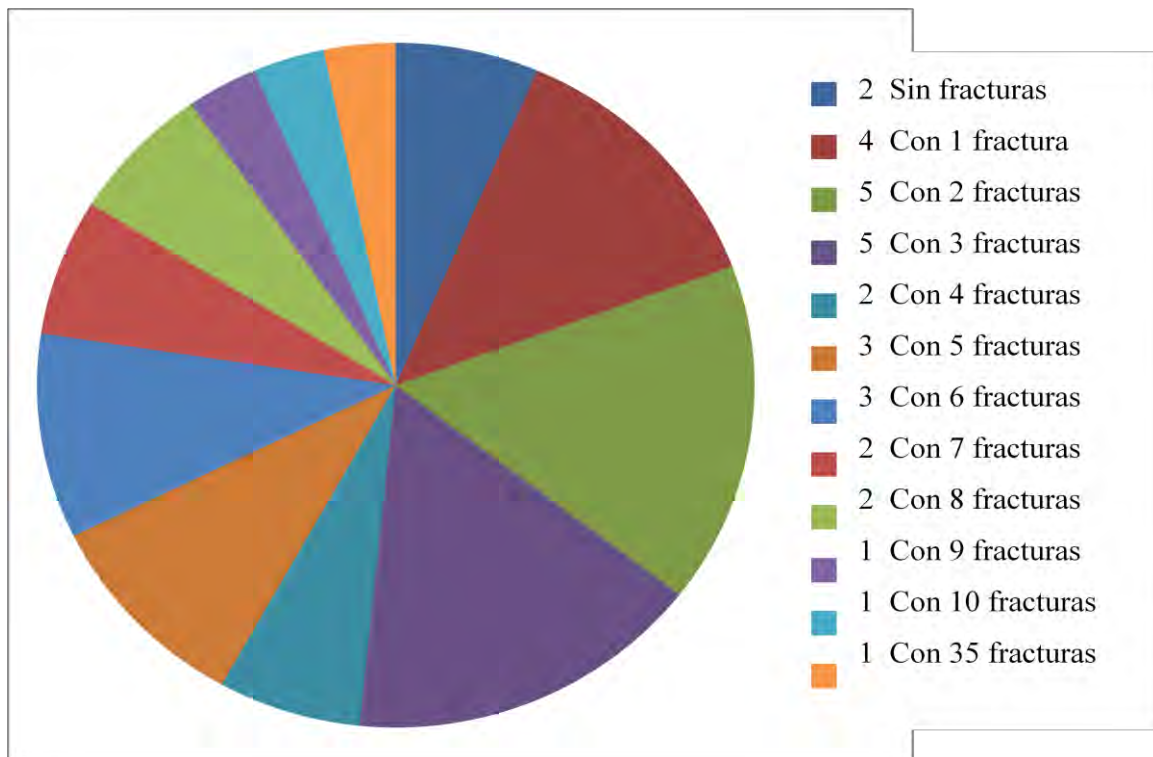


Figura 10.- Figura que muestra la frecuencia de las fracturas, en ambos extremos podemos observar que 2 pacientes con OI tipo I no han presentado fracturas, mientras que uno con tipo III ha presentado 35 fracturas.

La hiperlaxitud articular, es otra característica explorada en los pacientes, sin embargo aunque en la literatura médica se describe como frecuente, en nuestro estudio solo 7 pacientes (22.5 %) lo presentaron, el resto aunque presentaba algunos criterios no completaban estos para considerar la característica.

La facies triangular es una característica descrita frecuentemente en los pacientes con OI, en nuestro estudio fue un rasgo frecuente ya que 14 pacientes (45.16 %), lo presentaron, sin embargo en frecuencia casi similar encontramos 9 pacientes (29 %) con facies redonda y 8 (25.8 %) con facies alargada, los casos más representativos se muestran en las figuras 11 y 12.

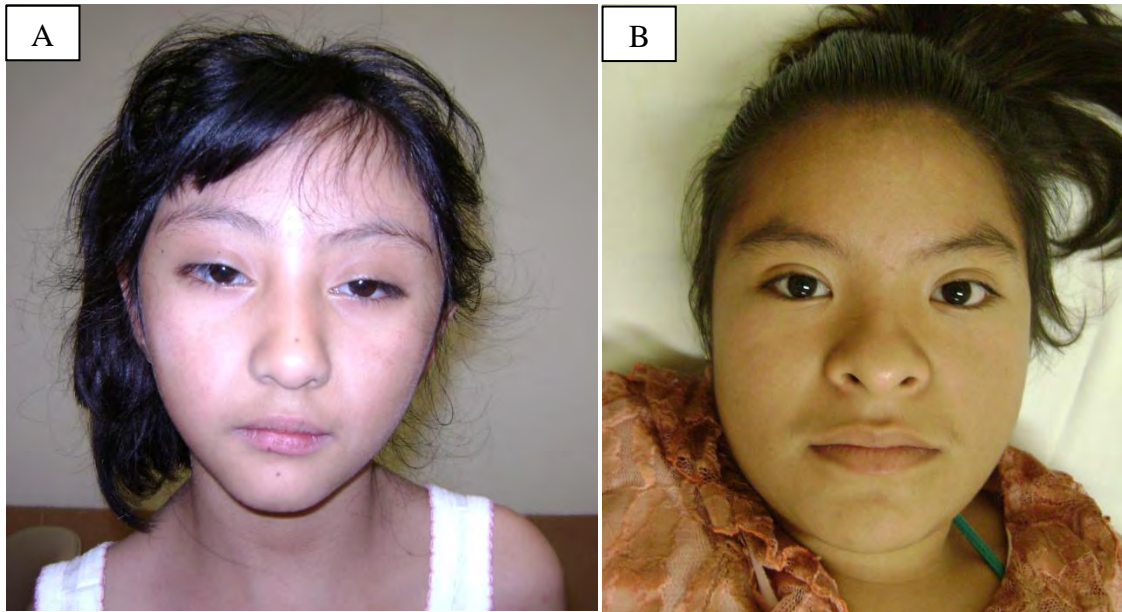


Figura 11.- A) Paciente 15 con OI tipo I, y facies triangular, se observa además descenso de hombro derecho por escoliosis. B) Paciente 16 con OI tipo IV y facies redonda.

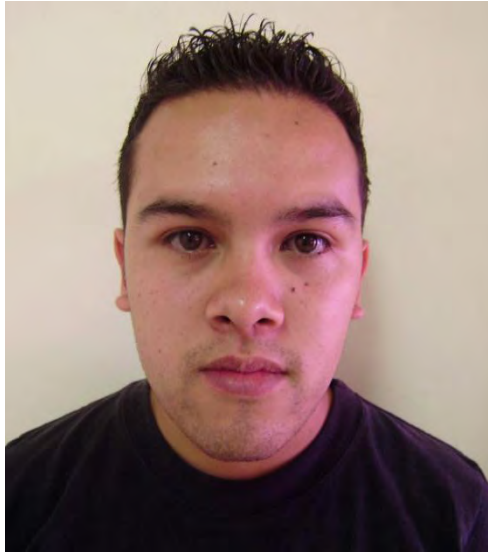


Figura 12.- paciente 10 con OI tipo I y facies alargada

Las escleróticas azules fue una de las características frecuentes en nuestros pacientes ya que 29 pacientes (93.549) lo presentaron en grados variables, los otros 2 no manifestaron el dato clínico (figura 13).



Figura 13.- paciente 11 con OI tipo I y escleróticas azules.

Otro dato clínico descrito en la OI es la dentinogénesis imperfecta, caracterizado por dientes opalescentes y fragilidad de los mismos, en nuestro estudio clínico 11 pacientes (35.48 %) presentaron el dato clínico (figura 14).



Figura14.- paciente 2 con OI tipo 1 pertenece a la familia 1, y todos los miembros de la familia presenta el dato clínico.

La hipoacusia es una dato clínico descrito como muy frecuente después de la adolescencia debido a microfracturas de la cadena oscicular del oído medio el porcentaje bajo en nuestra población puede explicarse por la predominancia de la OI tipo I, así como la edad preadolescente predominante, el dato clínico estuvo presente solo en 10 pacientes (32.25%), quienes mostraron hipoacusia de grados variables; en su mayoría fueron de la familia 1 con OI tipo I y en algunos con tipo IV, como se muestra en la figura 15.

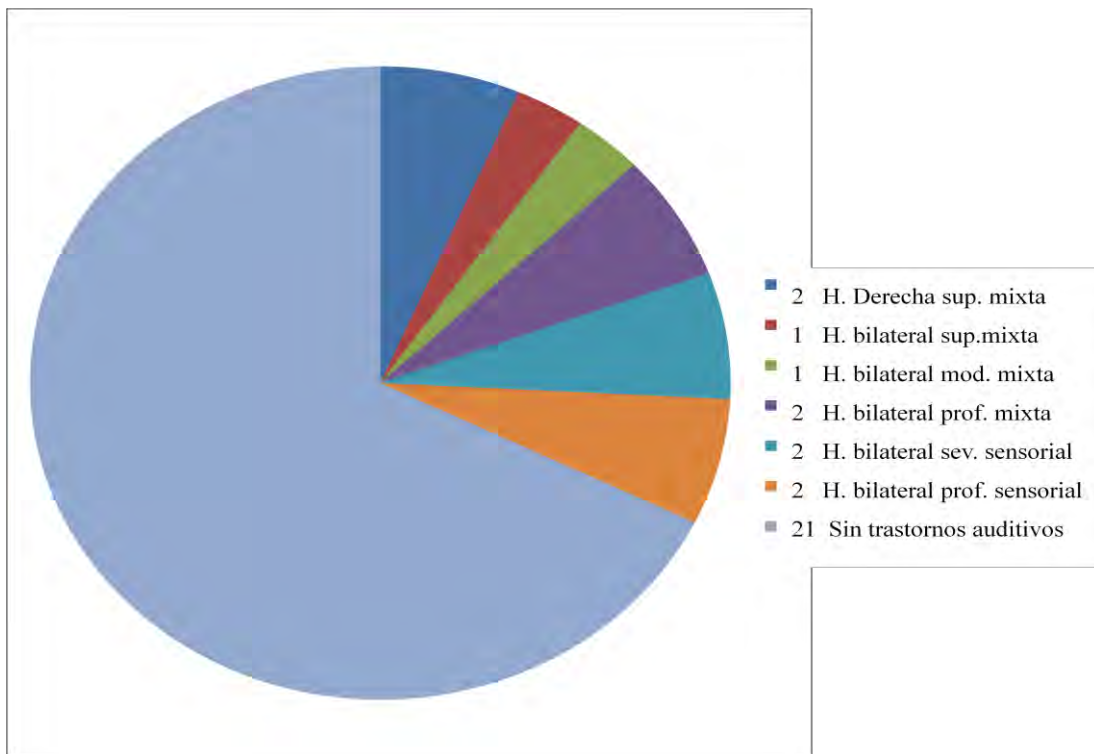


Figura 15.- Pacientes con OI e hipoacusia. Con excepción del paciente 12, con OI tipo IV, todos los demás pertenecieron al grupo con OI tipo I, 4 miembros de la familia 1 presentaron hipoacusia. En forma importante 21 pacientes resultaron con audición normal.

Análisis radiológico

Se analizaron los estudios radiológicos en busca de los datos descritos en la literatura médica, estos estudios incluyeron radiografías de cráneo, columna cervical, dorsal y lumbosacra así como radiografías de humero, cubito y radio, fémur tibia y peroné todos con proyecciones anteroposterior y lateral.

En las radiografías de cráneo se observaron huesos Wormianos en los pacientes 15, 17, 18, y 20, la paciente 15 con OI tipo I los pacientes 17 y 18 con OI tipo IV y el último con OI tipo III. Mientras que la platibasia (un aumento en el ángulo de Boogard por arriba de 140° , que se mide sobre dos líneas, una va del centro de la silla turca al nasion y la otra del centro de la silla turca a la parte anterior del foramen magno, el ángulo normal va de 115 a 140°) solo se observó en el paciente 20 con OI tipo III, por lo que se muestra en la figura 16, el resto de los pacientes presentaron ángulos de entre 118° a 140° , no compatibles con este dato clínico. Debido a la marcada osteopenia en esta región se pudo observar en la mayoría de los pacientes los trazos venosos intracraneales.

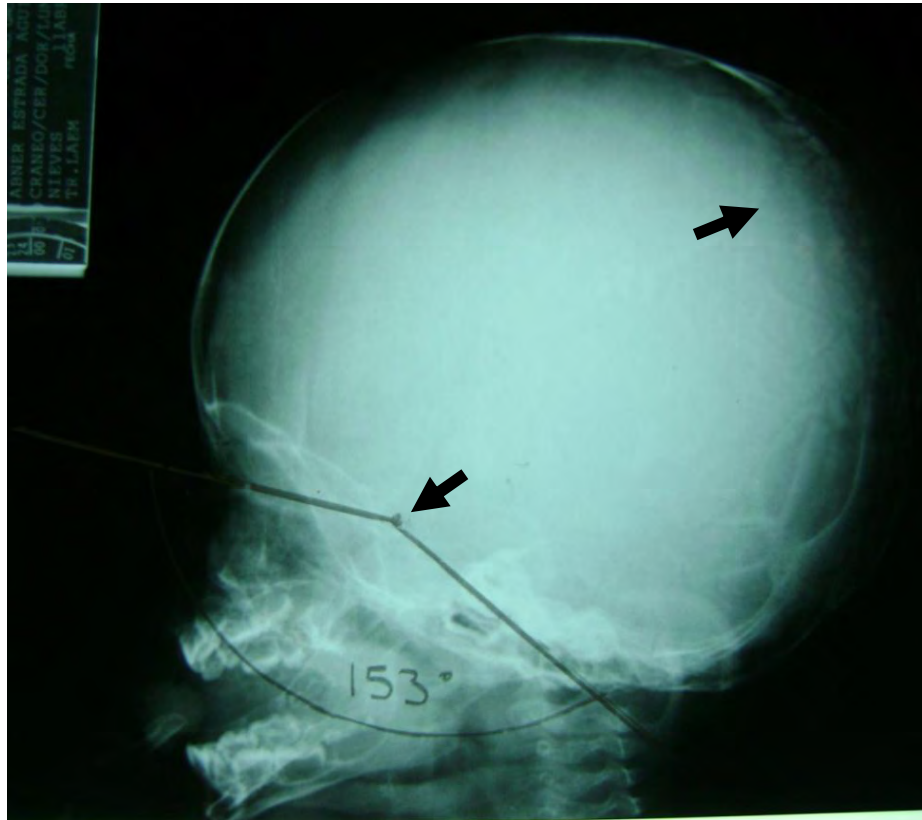


Figura 16.- radiografía de cráneo en proyección lateral del paciente 18, donde se muestra (flechas) presencia de huesos wormianos y platibasia, con un ángulo de Boogard de 153 °.

La platispondilia no fue un dato muy frecuente en nuestra población de pacientes ya que solo se observó en 3 de ellos con OI tipo 3. Mientras que la escoliosis si fue un dato clínico presente casi uniformemente, 24 pacientes de diferentes tipos de OI presentaron grados variables de escoliosis. Un dato característico en la familia 1 fue la presencia de otras malformaciones vertebrales, por ejemplo el paciente 5 quien presentó hemivértebra a nivel de T8 que le condicionó una escoliosis más severa; en la misma familia el paciente 6, y el paciente 23 no relacionado a esta familia, presentaron espina bífida oculta en L1, que presentó el mismo dato en el mismo sitio. Además los pacientes 1, 2, 6 y 14

presentaron sacralización de 5ª vértebra lumbar (figura 17). Los cambios degenerativos se observaron con más frecuencia en la familia 1, donde se observaron presencia de osteofitos y esclerosis en los espacios intersomáticos.

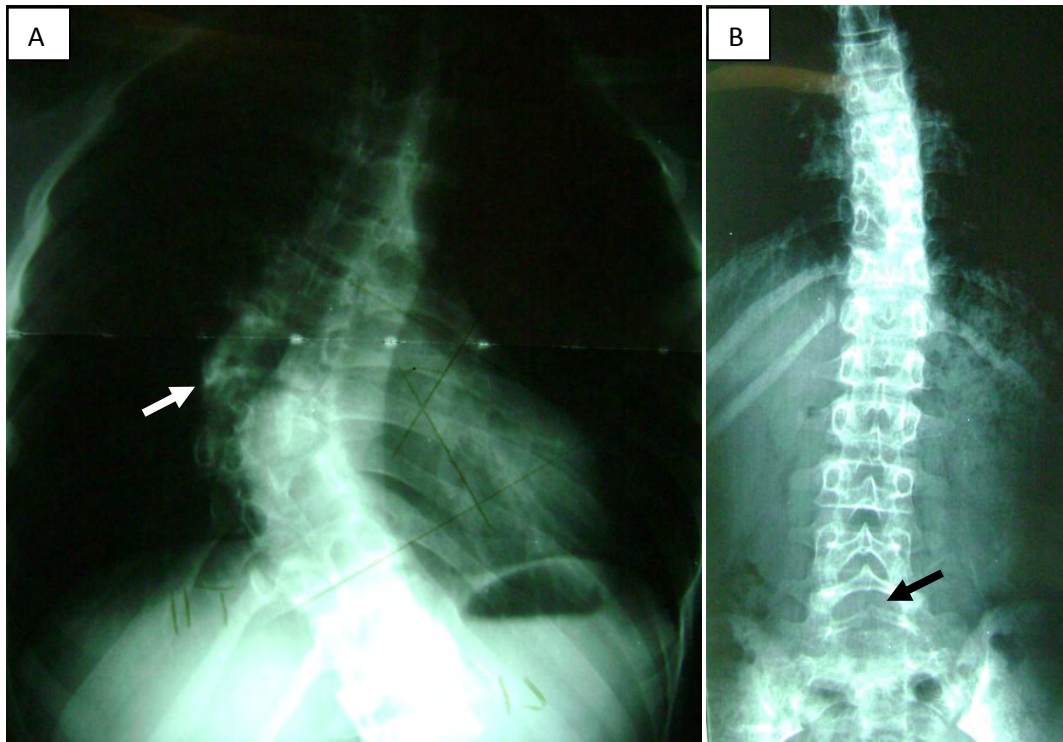


Figura 17.- A) radiografía de columna dorsal en proyección anteroposterior del paciente 5, la flecha muestra una hemivértebra a nivel de T8 que le exacerba la escoliosis, B) radiografía de columna en AP de paciente 6, se muestra con la flecha la espina bífida oculta en L1.

La osteopenia generalizada fue un dato característico en todos los pacientes estudiados, aunque con grados variables la cual se observó sobre todo a nivel metafisiario y en cráneo (figura 18).



Figura 18.- arriba se muestran radiografías de cráneo de la paciente 2 con OI tipo I, donde se observa marcada osteopenia a nivel de cráneo. Abajo radiografías del paciente 15 y 18 donde se observa marcada osteopenia y presencia de una placa de osteosíntesis por corrección quirúrgica de fractura a nivel peroneal, y sitios de fractura en fémur, tibia y peroné, respectivamente.

Una vez más un dato característico en la familia 1 y en algunos pacientes no relacionados fue el engrosamiento de la cortical a nivel la diáfisis de los huesos

largos que ocasionalmente originó estenosis de la medula ósea (figura 19). En el resto de los pacientes fue común el adelgazamiento de la misma.

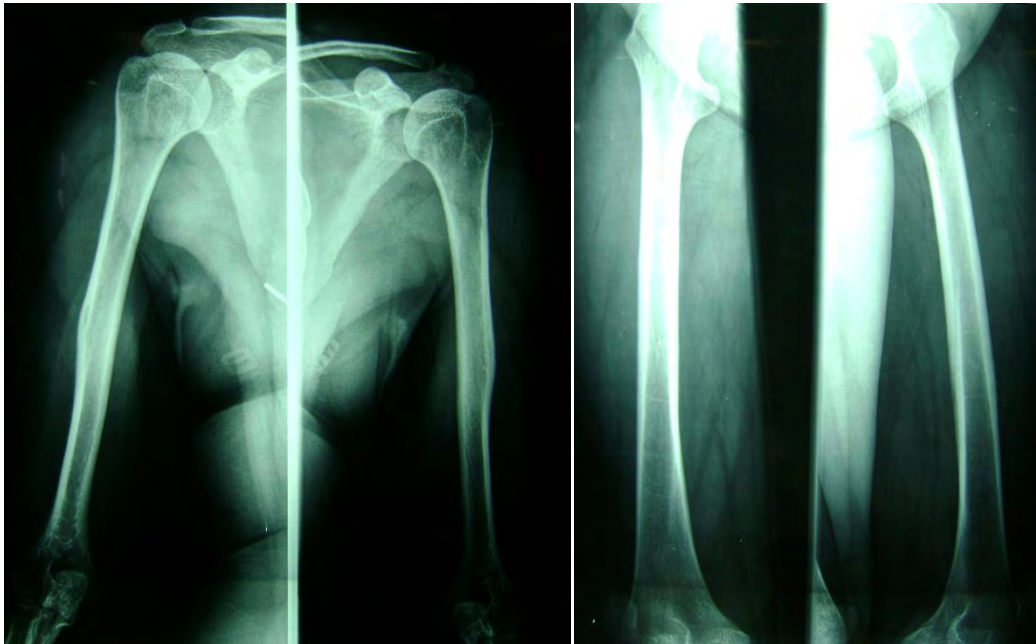


Figura 19.- Radiografías de huesos largos de la paciente 2 de la familia 1, ella y todos los hermanos presentan engrosamiento de la cortical y abombamiento a nivel de diáfisis de humeros.

El aplanamiento metafisiario así como la deformidad esquelética, solo se observó en los pacientes con OI tipo 3 y en 2 pacientes con OI tipo 4, en todos ellos la deformidad fue en los sitios de fractura que al consolidar deformaron el hueso afectado (figura 20 y 21).

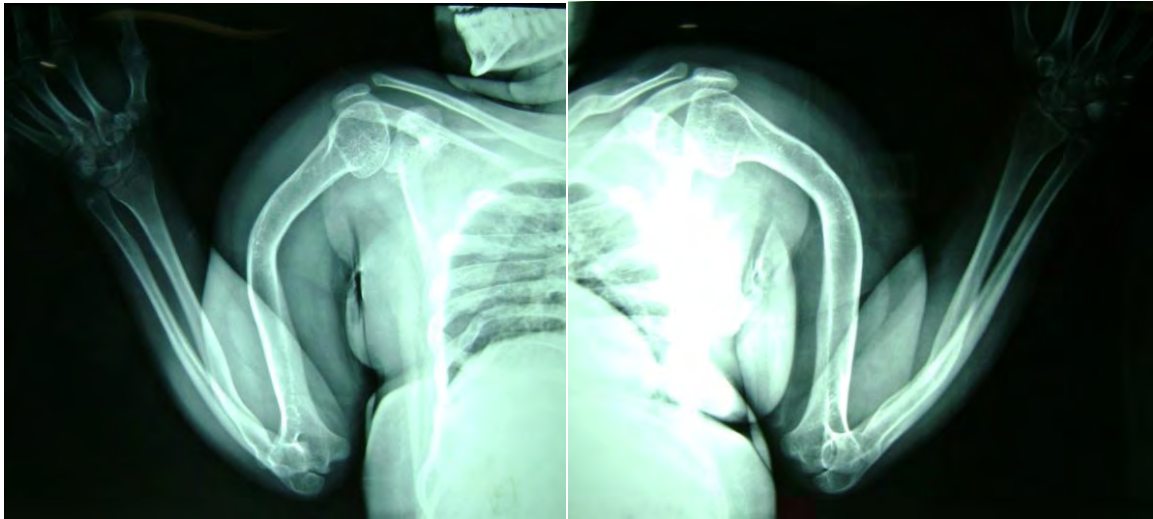


Figura 20.- Radiografía de extremidades superiores de la paciente 16 con OI tipo IV donde se observa deformidad importante en ambos humeros.

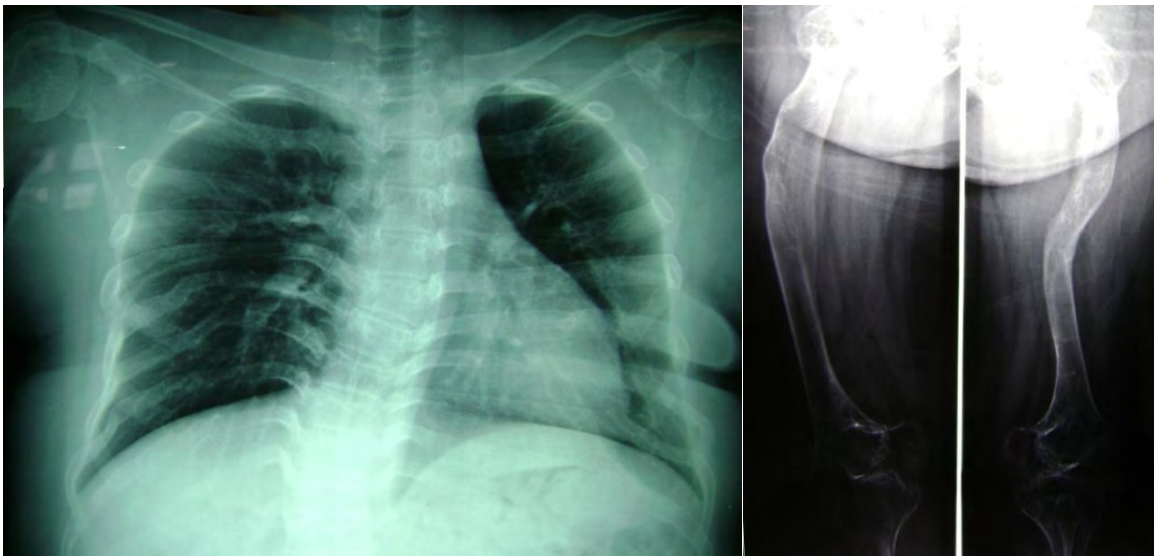


Figura 21.- Radiografías de la misma paciente donde se muestra deformidad torácica, en fémures y ensanchamiento metafisiario.

Resultados de análisis molecular

Se realizó secuenciación directa de los exones 8, 11, 15, 33/34 y 44 del gen COL1A1 en 30 pacientes incluyendo las uniones intrón-exón tanto en 5' como en 3'. La paciente 31 fue eliminada del estudio molecular ya que la cantidad de DNA obtenida fue insuficiente.

Exón 8

El exón 8 de COL1A1 está conformado de un fragmento de 54 nucleótidos, contiene 6 codones para la glicina en cada tercera posición. Fue secuenciado con el primer forward, flanqueado por 90 nucleótidos del intrón 7 hacia 5' y 56 nucleótidos del intrón 8 hacia 3'. El resultado fue normal para todos los pacientes estudiados (figura 22).

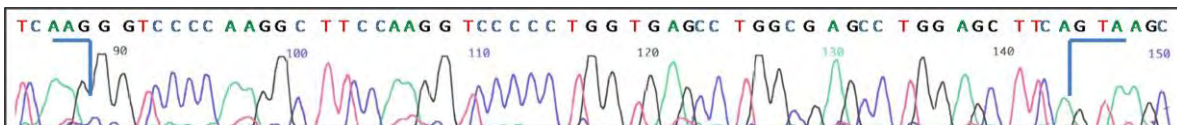


Figura 22.- Se muestran las secuencias del exón 8, flanqueado por las secuencias consenso en la unión intrón-exón en 5' con AG y en la región 3' con GT necesarios para el splicing.

Exón 11

El exón 11 de COL1A1 está conformado por un fragmento de 54 nucleótidos, contiene también 6 codones para la glicina en cada tercera posición, fue secuenciado con primer forward y flanqueado por 76 nucleótidos del intrón 10 hacia 5' y 128 nucleótidos del intrón 11 hacia 3', todos los pacientes tuvieron secuencias normales para este exón así como para las uniones intrón-exón (figura 23).

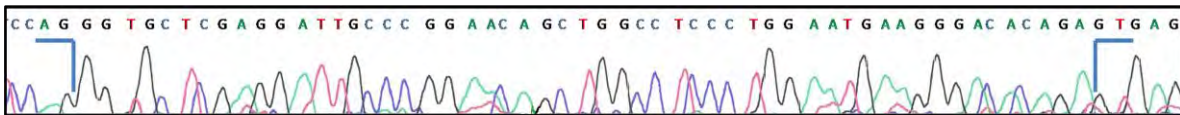


Figura 23.- secuencias del exón 11 flanqueado por las secuencias consenso de unión intron-exón, AG en el extremo 5' y GT en el extremo 3'.

Exón 15

El exón 15, conformado por un fragmento de 45 nucleótidos, contiene 5 codones para glicina en cada tercera posición, fue secuenciado con el primer reverse, flanqueado por 65 nucleótidos del intrón 14 hacia 5' y 123 nucleótidos del intrón 15 hacia 3' (figura 24), todos los pacientes estudiados mostraron secuencias normales para esta región.

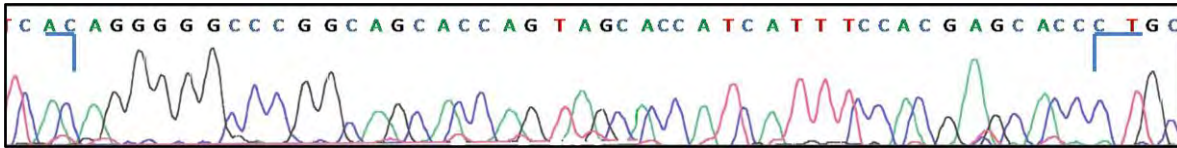


Figura 24.- Secuencias del exón 15, flanqueado por las secuencias consenso AG en el extremo 5' y GT en el extremo 3'; debido a que la secuenciación se realizó con el primer reverso, la secuencia va en sentido contrario y con los nucleótidos complementarios.

Exones 33/34

Los exones 33/34 se encuentran fusionados según lo descrito por Jarmo Korkko y cols. (17). Quienes realizaron estudio molecular a través del estudio de RNA mensajero en cultivo de fibroblastos. En conjunto constan de un fragmento de 108 nucleótidos, y contienen 12 codones para la glicina en cada tercera posición. Fueron secuenciados con el primer reverse, flanqueados por 61 nucleótidos del intrón 32 hacia 5' y 92 nucleótidos del intrón 34 hacia 3' (figura 25). En el nucleótido 15778 de la secuencia publicada en el NCBI Reference Sequence: NG_007400.1, actualizado el 11 de agosto de 2009, se encuentra una T, que forma un codón ACT que codifica para la treonina, sin embargo en todos nuestros pacientes este nucleótido T es sustituido por una C formándose el codón ACC que codifica para el mismo aminoácido, este hallazgo ya ha sido referido (21) y coincide con la secuencia publicada GenBank: AF017178.2, el 29 de abril de 2008.

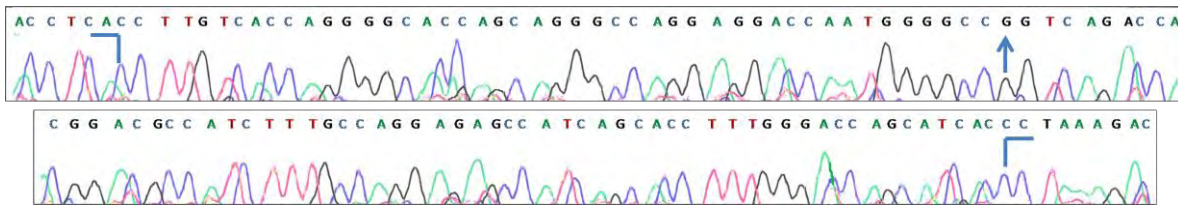


Figura 25.- secuencias de los exones 33/34 complementarias a la cadena sentido de DNA, flanqueados por las secuencias consenso de unión intrón-exón, AG en el extremo 5' y GT en el extremo 3' con una flecha se muestra el sitio de cambio de T-C ya descrito.

Exón 44

El exón 44 está constituido de 108 nucleótidos y contiene 12 codones para la glicina, fue secuenciado con primer forward. En 13 pacientes las secuencias fueron normales (figura 26), mientras que en la familia 1 y 3, así como 9 pacientes no relacionados se encontró una inserción del nucleótido G al inicio del exón (figura 27).

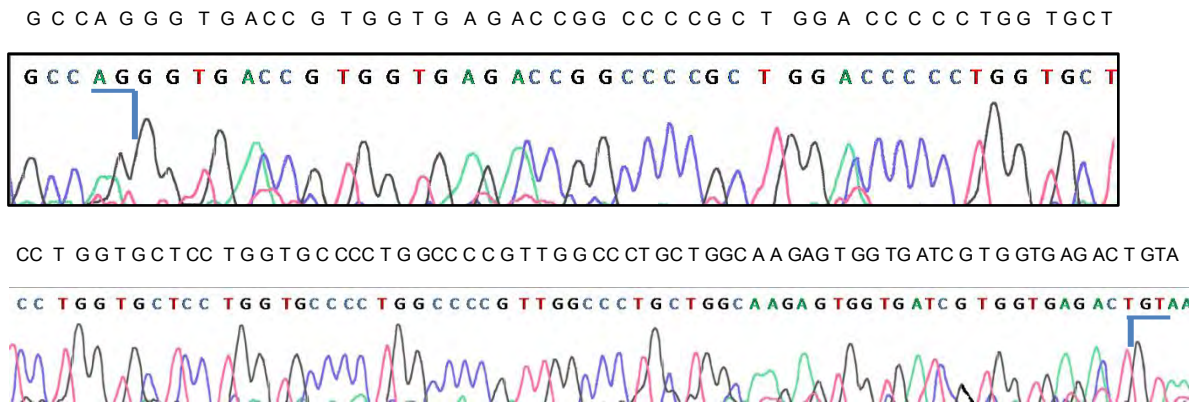


Figura 26.- se muestra las secuencias del genbank y abajo la secuencia normal de un paciente. Se muestra el fragmento y las secuencias consenso de unión intrón/exón en ambos extremos.

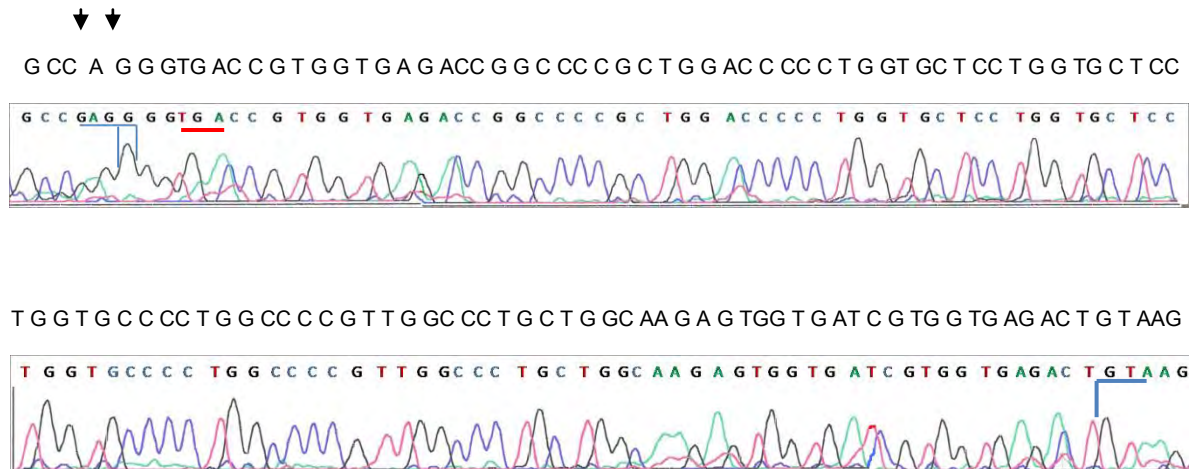


Figura 27.- se muestra las secuencias del genbank del exón 44 y abajo las secuencias de un paciente con la inserción de una G al inicio del mismo exón; se muestra además un codón de paro escondido que se produce por la inserción de una guanina al inicio del exón.

DISCUSION

La osteogénesis imperfecta es un trastorno clínicamente heterogéneo con marcada variabilidad clínica incluso dentro de las mismas familias. En el presente estudio, se encontraron la mayoría de los datos clínicos reportados en la literatura. En nuestra población se observó predominancia de la OI tipo I (23 pacientes) sobre la tipo III (3 pacientes) y la tipo IV (5 pacientes). Se puede observar en los árboles genealógicos de los tres casos familiares el patrón vertical de transmisión característico de las enfermedades autosómicas dominantes. La variabilidad clínica en la familia 1 es muy notoria, ya que hay miembros de la misma que han presentado múltiples fracturas mientras que otros presentan fenotipo muy leve sin ninguna fractura a pesar de la edad y la realización de actividades ocupacionales de alto impacto. En relación a la edad de inicio de las fracturas y el número de éstas referidas por los pacientes se pudo observar también variabilidad clínica, para los pacientes con OI tipo III y IV se refirieron fracturas *in utero*, mientras que en los pacientes con OI tipo I la edad de inicio y el número de fracturas fue más variable desde los 5 meses hasta los 32 años. La facies triangular es un dato clínico referido en la literatura (3), ésta característica estuvo presente casi en la mitad de la población estudiada. Las escleróticas azules, fue un dato clínico presente en 29 pacientes, esta característica está dada por la disminución en la cantidad de colágena en las escleróticas, que permite la translucencia de la capa coroides del globo ocular, región altamente vascularizada, dándole el aspecto azulado (2). La hipoacusia se presenta inicialmente conductiva debido a microfracturas de la cadena oscicular del oído medio, sin embargo se ha descrito que la evolución

progresiva finalmente se torna neurosensorial, en la literatura médica se describe que 50 % de los pacientes cursan con este dato clínico (3), en nuestra población se observó solo en un 32 %; la diferencia puede deberse a que varios de nuestros pacientes se encuentran en edad preadolescente por lo que se puede esperar la aparición de esta característica una vez alcanzada la adolescencia.

El análisis radiológico permitió el hallazgo de varios datos como la presencia de huesos wormianos en 4 pacientes y la platibasia en un paciente con OI tipo III. Así también se observó escoliosis, presente en 24 pacientes, no así la platispondilia que solo se observó en tres pacientes con OI tipo III. Es importante hacer notar la presencia de otras malformaciones vertebrales en la familia 1 quienes mostraron defectos de cierre, caracterizado por espina bífida, así como hemivértebras y sacralización de la quinta vértebra lumbar, dato que presentó otro paciente no relacionado, debido a que este dato no ha sido descrito en asociación con la OI, y dado que su frecuencia es alta en población mexicana podríamos considerar esta asociación como aleatoria. Otros cambios morfológicos óseos en ésta familia diferentes a los demás pacientes fue el engrosamiento de la cortical de los huesos largos así como el abombamiento a nivel humeral en todos los miembros de la familia 1 afectados.

Se realizó análisis molecular de 6 exones en el gen COL1A1, encontrando secuencias normales en los exones 8, 11, 15, 33/34, incluyendo secuencias de unión intrón–exón de éstas regiones, sin embargo al secuenciar el exón 44 se encontró una inserción de un nucleótido G en los primeros nucleótidos de éste exón en 17 pacientes: Los 6 afectados de la familia 1, 2 de la familia 2 y 9 pacientes no relacionados. Según las secuencias observadas, los individuos

parecen mostrar estado homocigoto para la inserción, sin embargo debe considerarse que ese estado resultaría en la aparición de un codón de terminación prematura en el siguiente codón que en teoría produciría una proteína truncada y por lo tanto un fenotipo severo de la enfermedad, no obstante los pacientes presentan un fenotipo leve. Por otra parte cabe la posibilidad de que los pacientes solo tengan este cambio en estado heterocigoto, que ocasionaría solo un estado de haploinsuficiencia del gen, traducándose en un fenotipo leve, dato clínico presente en los pacientes afectados, que se encuentran clasificados como OI tipo I; una forma de elucidar tal controversia sería el análisis molecular por separado de ambas hebras de DNA, aunque por el momento no contamos con los medios necesarios para hacerlo.

CONCLUSIONES

El estudio clínico realizado en este grupo de pacientes permite observar entre otras cosas la expresividad variable del padecimiento, y corroborar los datos clínicos descritos en la literatura médica, así como algunos hallazgos clínicos importantes relacionados con la presencia de defectos vertebrales y la deformidad humeral en la familia 1.

Debido al tamaño del gen COL1A1 (52 exones), en este trabajo solo se han explorado exones con mayor tasa de mutaciones, esto limita en forma importante para realizar una correlación genotipo-fenotipo por lo que solo representa el inicio de un abordaje molecular en un pequeño grupo de pacientes. El hallazgo clínico de los defectos vertebrales, la deformidad humeral presente en los miembros de la

parecen mostrar estado homocigoto para la inserción, sin embargo debe considerarse que ese estado resultaría en la aparición de un codón de terminación prematura en el siguiente codón que en teoría produciría una proteína truncada y por lo tanto un fenotipo severo de la enfermedad, no obstante los pacientes presentan un fenotipo leve. Por otra parte cabe la posibilidad de que los pacientes solo tengan este cambio en estado heterocigoto, que ocasionaría solo un estado de haploinsuficiencia del gen, traducándose en un fenotipo leve, dato clínico presente en los pacientes afectados, que se encuentran clasificados como OI tipo I; una forma de elucidar tal controversia sería el análisis molecular por separado de ambas hebras de DNA, aunque por el momento no contamos con los medios necesarios para hacerlo.

CONCLUSIONES

El estudio clínico realizado en este grupo de pacientes permite observar entre otras cosas la expresividad variable del padecimiento, y corroborar los datos clínicos descritos en la literatura médica, así como algunos hallazgos clínicos importantes relacionados con la presencia de defectos vertebrales y la deformidad humeral en la familia 1.

Debido al tamaño del gen COL1A1 (52 exones), en este trabajo solo se han explorado exones con mayor tasa de mutaciones, esto limita en forma importante para realizar una correlación genotipo-fenotipo por lo que solo representa el inicio de un abordaje molecular en un pequeño grupo de pacientes. El hallazgo clínico de los defectos vertebrales, la deformidad humeral presente en los miembros de la

familia 1 y el hallazgo molecular acerca de la inserción de una G en el extremo 5' del exón 44, son datos que deberán corroborarse estudiando un número mayor de pacientes.

Indudablemente es necesario secuenciar más exones y aumentar la muestra de población para inferir la distribución de las mutaciones en los genes de la colágena tipo1 en población mexicana, por lo que el seguimiento de este trabajo es fundamental para lograr un abordaje molecular completo y obtener datos concluyentes en relación a este padecimiento.

ANEXOS

Anexo 1.- carta de consentimiento informado.



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

México, D.F. a de de 200 .

A Quien Corresponda:

Por medio de la presente, informo que he dado mi consentimiento en forma libre, voluntaria y sin presiones para que mi hijo (a) participe en el trabajo de investigación clínica, para estudiar pacientes con osteogénesis imperfecta, a cargo de la Dra. Margarita Valdés Flores del Dr. Antonio Miranda Duarte, que se realiza en el Servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Previamente, se me ha explicado que existen varios factores hereditarios que se transmiten de generación en generación (de padres a hijos), que podrían aumentar la posibilidad de que aparezca una enfermedad, como las mutaciones en los genes de la colagena tipo 1; COL1A1 y COL1A2. El propósito de esta investigación es saber si las mutaciones en estos genes en pacientes mexicanos es similar como en otras poblaciones; para esto, es necesario reunir un grupo de pacientes con esa enfermedad y otro grupo de pacientes sin la enfermedad. Luego, se va a tomar una muestra de sangre con una jeringa en la vena del brazo; ya que de la sangre se puede obtener una muestra del material hereditario y allí se puede saber si el factor hereditario que quieren estudiar está presente o no. Esa toma de muestra es igual a la que realizan en los laboratorios y es un procedimiento sencillo que no tiene peligros, si acaso, podría formarse un moreton.



Se me comentó también que todo este procedimiento no tiene ningún costo para mí, y que no es necesario para hacer un diagnóstico o darme un tratamiento para mi padecimiento, pero entiendo que con los resultados de ésta investigación se conocerá mejor a la enfermedad y, posiblemente, los elementos que la desencadenan. También se me explicó que es posible que guarden una parte del material hereditario que se obtenga de la sangre, por que es posible que después estudien otros factores que en este momento no pueden ser analizados.

Asimismo, se me ha explicado que me es posible solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación, que estoy en libertad de negarme a participar en el presente estudio y, que en ese caso, la atención que recibo en esta Institución no cambiará.

Nombre del padre o tutor

Firma

Nombre del investigador

Firma

Anexo 1.- Hoja de recolección de datos (anverso)



INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION
SERVICIO DE GENETICA
PROTOCOLO DE OSTEOPENIA IMPERFECTA
HOJA DE RECOLECCION DE DATOS



NOMBRE: _____ NO. DE EXP.: _____ NO CASO _____
 FECHA DE NAC.: _____ EDAD: _____ SEXO: _____ ORIGEN _____
 DOMICILIO _____ TELEFONO: _____
 ESCOLARIDAD _____ OCUPACION _____ CONSANGUINIDAD _____ ENDOGAMIA _____

ARBOL GENEALOGICO

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES:

NOMBRE DEL PADRE _____ FECHA DE NAC. _____
 LUG. DE NAC. _____ ESCOLARIDAD: _____ OCUPACION: _____
 NOMBRE DE MADRE _____ FECHA DE NAC. _____
 LUG. DE NAC. _____ ESCOLARIDAD: _____ OCUPACION _____

ANTECEDENTES PERINATALES:

G _____ P _____ C _____ A _____ DURACION DEL EMBARAZO _____
 TERATOGENOS _____ CUALES _____
 AMENAZA DE ABORTO _____ MES _____ MOVILIDAD FETAL _____
 PARTO: _____ PESO: _____ TALLA _____ APGAR _____
 COMPLICACIONES _____

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

DATOS CLINICOS

PESO	TALLA	%	PC	SS
SISTEMA MUSCULO-ESQUELETICO	FRACTURAS: SITIO Y EDAD DE INICIO: _____ OTROS SITIOS Y EDADES DE PRESENTACION _____ _____ _____ TOTAL DE FRACTURAS _____ DOLOR _____ ESCOLIOSIS: _____ PECTUS EXCAVATUM _____ PECTUS CARINATUM _____ HIPERLAXITUD ARTICULAR (No DE CRITERIOS DE BEHIGTON) _____ LUXACION ARTICULAR _____ PIE PLANO _____ PIE EQUINO _____ HIPOTONIA MUSCULAR _____ SOSTEN CEFALICO _____ SEDESTACION _____ BIPEDESTACION _____ DEAMBULACIÓN _____ DEFORMIDAD AL NACIMIENTO Y ACTUAL: _____ CRANEO _____ EXTREMIDADES _____ COLUMNA _____			
CRANEO Y CARA	FACIES TRIANGULAR _____ MACROCRANEO _____ FRENTE AMPLIA _____ ENSANCHAMIENTO TEMPORAL _____ ESCLEROTICAS AZULES _____ GLAUCOMA _____ CORNEAS CON ANILLO DE SATURNO _____ EMBRIOTOXON _____ HIPERMETROPIA _____ KERATOCONO _____ MEGALOCORNEA _____ ECTOPIA LENTIS _____			
PIEL Y ANEXOS	PIEL SUAVE _____ LISA _____ DELGADA _____ ATROFICA _____ CICATRICES AMPLIAS _____ FRAGILIDAD CAPILAR _____ ELASTOSIS PERFORANTE _____			
OIDO	SORDERA CONDUCTIVA _____ NEUROSENSORIAL _____ MIXTA _____ EDAD DE INCIO _____ TINITUS _____ VERTIGO _____ AUDIOMETRIA _____ VIDEO-NISTAGMOGRAFIA _____			
CARACTERISTICAS DENTALES	INICIO DE LA DENTICION _____ DENTINOGENESIS IMPERFECTA _____			
CARDIOVASCULAR	DILATACION DE LA RAIZ AORTICA _____ PROLAPSO DE VALVULA MITRAL _____ COR PULMONALE _____ EPISTAXIS _____ HEMOPTISIS _____ TIEMPO DE SANGRADO PROLONGADO _____			
SISTEMA NERVIOSO	TRASTORNO CEREBELAR _____ DORSALGIA _____ HIDROCEFALIA _____ MACROCEFALIA _____ ATROFIA CORTICAL _____ IMPRESIÓN BASILAR _____			

DATOS RADIOLOGICOS

CRANEO	HUESOS WORMIANOS _____ PLATIBASIA _____
COLUMNA	PLATISPONDILIA _____ CODFISH _____ HERNIA DISCAL _____ GRADO DE ESCOLIOSIS/CIFOESCOLIOSIS _____
EXTREMIDADES	OSTEOPENIA _____ ADELGAZAMIENTO DE LA CORTICAL _____ METAFISIS PLANAS _____ PROTRUSION ACETABULAR _____ DEFORMIDADESQUELETICA _____ LOCALIZACION _____ FORMACION DE CALLOS OSEOS _____ CALCIFICACION DE LA MEMBRANA INTERÓSEA RADIOCUBITAL _____
OTRAS	COSTILLAS EN CUENTA DE ROSARIO _____ ACORTAMIENTO RIZOMELICO _____ MICROMELIA _____

Anexo 3.- Tabla de pacientes estudiados, nombre, origen, edad y tipo de Oi.

	NOMBRE	ORIGEN	SEXO	EDAD	TIPO	FAM O ESP
1	FELIX ANTONIO LAZCANO ROSAS	PUEBLA	M	36 AÑOS	I	FAMILIAR
2	MERCEDES LAZCANO ROSAS	PUEBLA	F	32 AÑOS	I	FAMILIAR
3	ALEJANDRO LAZCANO ROSAS	PUEBLA	M	25 AÑOS	I	FAMILIAR
4	MARGARITA LAZCANO MEDEL	PUEBLA	F	27 AÑOS	I	FAMILIAR
5	ALFONSO LAZCANO MEDEL	PUEBLA	M	18 AÑOS	I	FAMILIAR
6	RODRIGO HIPATL LAZCANO	PUEBLA	M	11 AÑOS	I	FAMILIAR
7	ESTELA PIMENTEL MENDOZA	EDO. MEX	F	52 AÑOS	I	FAMILIAR
8	MARIA DELA C. PIMENTEL MENDOZA	EDO. MEX	F	44 AÑOS	I	FAMILIAR
9	LUIS ALFONSO MORENO PIMENTEL	DF	M	7 AÑOS	I	FAMILIAR
10	JORGE RACIEL DELGADO VELAZQUEZ	DF	M	24 AÑOS	I	FAMILIAR
11	GAEL AMAURY DELGADO LOPEZ	DF	M	4 AÑOS	I	FAMILIAR
12	GABRIEL JIMENEZ MELENDEZ	DF	M	52 AÑOS	IV	FAMILIAR
13	CRISTINA ALICIA LUCKIE DUQUE	DF	F	9 AÑOS	IV	FAMILIAR
14	GEORGINA SERVIN GUZMAN	DF	F	11 AÑOS	I	FAMILIAR
15	CECILIA GABRIELA RAMIREZ PLATA	EDO. MEX	F	10 AÑOS	I	ESPORAD
16	MA DEL CARMEN HIDALGO CATALAN	DF	F	16 AÑOS	IV	ESPORAD
17	FLOR EDITH CRUZ MARTINEZ	EDO. MEX	F	14 AÑOS	IV	ESPORAD
18	ABNER ESTRADA AGUILAR	QUERETARO	M	11 MESES	III	ESPORAD
19	LEONARDO GONZALEZ MENDOZA	EDO. MEX	M	2 AÑOS	III	ESPORAD
20	JOSE MANUEL RODRIGUEZ TELLO	EDO. MEX	M	4 AÑOS	I	ESPORAD
21	EDER ALDAIR PRIMERO HERNANDEZ	DF	M	14 AÑOS	I	ESPORAD
22	GUSTAVO A. BECERRIL CONTRERAS	DF	M	13 AÑOS	I	ESPORAD
23	SANTIAGO PALACIO HERNANDEZ	DF	M	6 AÑOS	I	ESPORAD
24	PATRICIA SILVA MAYA	DF	F	16 AÑOS	I	ESPORAD
25	JUAN GUZMAN ARREDONDO	EDO. MEX	M	48 AÑOS	IV	ESPORAD
26	ANGEL DAVID ALANIS CRUZ	EDO. MEX	M	3 AÑOS	I	ESPORAD
27	BRANDON HIPOLITO MERAZ TAPIA	DF	M	10 AÑOS	I	ESPORAD
28	CESAR MUNGUIA VALADEZ	EDO. MEX	M	29 AÑOS	I	ESPORAD
29	CHRISTOFER GALICIA IBARRA	DF	M	3 AÑOS	I	ESPORAD
30	FABIOLA MALDONADO MAGAÑA	EDO. MEX	F	31 AÑOS	I	ESPORAD
31	PAMELA IZTEL PEREZ ROBLES	DF	F	3 AÑOS	I	ESPORAD

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Andrea Superti-Furga, Sheila Unger, and the Nosology Group of the International Skeletal dysplasia Society. **Nosology and Classification of Genetic Skeletal Disorders: 2006 Revision**. American Journal of Medical Genetics Part A 143A:1–18 (2007).
- 2.- Peter Beighton, M.D.,ph.D. HERITABLE DISORDERS OF CONNECTIVE TISSUE, **Osteogenesis Imperfecta**. Fifth edition.1993.
- 3.- Robert D Steiner , MD Melanie G Pepin , MS, CGC,Peter H Byers , MD. **Osteogenesis Imperfecta**. GeneReviews PubMed Book. January 28, 2005.
- 4.- L. M. Ward, F. Rauch, R. Travers, G. Chabot, E. M. Azouz, L. Lalic, P. J. Roughley, and F. H. Glorieux. **Osteogenesis Imperfecta Type VII: An Autosomal Recessive Form of Brittle Bone Disease**. Bone Vol. 31, No. 1. July 2002:12–18.
- 5.- Wayne A Cabral, Weizhong Chang, Aileen M Barnes, MaryAnn Weis, Melissa A Scott, Sergey Leikin,Elena Makareeva, Natalia V Kuznetsova, Kenneth N Rosenbaum, Cynthia J Tifft, Dorothy I Bulas,Chahira Kozma, Peter A Smith, David R Eyre & Joan C Marini. **Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta**. Nature Genetics Volume 39. number 3. March 2007.

6.- Moira S. Cheung & Francis H. Glorieux. **Osteogenesis Imperfecta: Update on presentation and management.** Rev Endocr Metab Disord (2008) 9:153–160.

7.- Online Mendelian Inheritance in Man. ([#166200](#)) **Osteogenesis Imperfecta type I**, ([#166210](#)) **Osteogenesis Imperfecta type IIA**, ([#610854](#)) **Osteogenesis Imperfecta type IIB**, ([#259420](#)) **Osteogenesis Imperfecta type III**, ([#166220](#)) **Osteogenesis Imperfecta type IV**, ([#610967](#)) **Osteogenesis Imperfecta type V**, ([#610968](#)) **Osteogenesis imperfect type VI**, ([#610682](#)) **Osteogenesis Imperfecta type VII**, ([#610915](#)) **Osteogenesis imperfect type VIII**.

8.- P.J. Roughley, F. Rouch and F.H. Glorieux. **Osteogenesis Imperfecta clinical and molecular diversity.** European cells and materials. Vol. 5 2003; pp41-47.

9.- Pei-Chiang Chang, Shiao-Yu Lin and Kuang Hung Hsu. **The craniofacial characteristics of osteogenesis imperfect patients.** European journal of orthodontics, 29, 2007, pp 232-237.

10.- D. O. Sillence, Alison Senn, and D. M. Danks. **Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta.** Journal of Medical Genetics, 1979, 16, 101-116.

11.- Moira S. Cheung & E. Michel Azouz & Francis H. Glorieux & Frank Rauch. **Hyperplastic callus formation in osteogenesis imperfecta type V: follow-up of three generations over ten years.** Skeletal Radiol (2008) 37:465–467.

12.- Dong Yeon Lee, Tae-Joon Cho, In Ho Choi, Chin Youb Chung, Won Joon Yoo, Ji Hyung Kim, Yong Koo Park. **Clinical and Radiological Manifestations of Osteogenesis Imperfecta Type V.** J. Korean Med Sci 2006; 21: 709-14.

13.- Francis h. Glorieux, Frank Rauch, Horacio Plotkin, Leanne Ward, Rose Travers, Peter Roughley, Ljiljana Lalic, Delphine f. Glorieux, Francois Fassier, Nicholas j. Bishop. **Type V Osteogenesis Imperfecta: A New Form of Brittle Bone Disease. Journal of Bone and Mineral Research, Volume 15, Number 9, 2000.**

14.- Francis H. Glorieux, Leanne M. Ward, Frank Rauch, Ljiljana Lalic, Peter J. Roughley, Rose Travers. **Osteogenesis Imperfecta Type VI: A Form of Brittle Bone, Disease with a Mineralization Defect. Journal of Bone and Mineral Research. Volume 17, Number 1, 2002.**

15.- Marini J. Falk, Shauna Heeger, Katherine A. Lynch, Kathleen R. DeCaro, Deborah Bohach, Karen S. Gibson and Matthew L. Warman. **Intravenous Bisphosphonate Therapy in Children With Osteogenesis Imperfecta. Pediatrics 2003;111;573-578**

16.-Egl Benušienė, Vaidutis Kuėinskis. **COL1A1 mutation analysis in Lithuanian patients with osteogenesis imperfecta. J. Appl. Genet. 44(1), 2003, pp. 95-102.**

17.- Jarmo Kořrkko, Leena Ala-Kokko, Anne De Paepe, Lieve Nuytinck, James Earley, and Darwin J. Prockop. **Analysis of the COL1A1 and COL1A2 Genes by PCR Amplification and Scanning by Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis Identifies Only COL1A1 Mutations in 15 Patients with Osteogenesis Imperfecta Type I: Identification of Common Sequences of Null-Allele Mutations. Am. J. Hum. Genet. 62:98–110, 1998.**

18.- Joan C. Marini, Antonella Forlino, Wayne A. Cabral, Aileen M. Barnes, James D. San Antonio, Sarah Milgrom, James C. Hyland, Jarmo Ko"rkko", Darwin J. Prockop, Anne De Paepe, Paul Coucke, Sofie Symoens, Francis H. Glorieux, Peter J. Roughley, Alan M. Lund, Kaija Kuurila-Svahn, Heini Hartikka, Daniel H. Cohn, Deborah Krakow, Monica Mottes, Ulrike Schwarze, Diana Chen, Kathleen Yang, Christine Kuslich, James Troendle, Raymond Dalgleish, and Peter H. Byers. **Consortium for Osteogenesis Imperfecta Mutations in the Helical Domain of Type I Collagen: Regions Rich in Lethal Mutations Align With Collagen Binding Sites for Integrins and Proteoglycans.** Human Mutation 28(3), 209-221,2007.

19.- James M. Pace, Mary Wiese, Andrea S. Drenguis¹, Natalia Kuznetsova, Sergey Leikin, Ulrike Schwarze, Diana Chen, Suzanne H. Mooney†, Sheila Unger, Peter H. Byers. **Defective c-propeptides of the proa2(I) chain of type I procollagen impede molecular assembly and result in osteogenesis imperfect.** www.jbc.org by on May 7, 2008.

20.- Raymond Dalgleish. **COL1A2 Systematic Numbering of DNA and Protein Sequences.** Version 2.1: May 2007.

21.- Raymond Dalgleish. **COL1A1 Systematic Numbering of cDNA and Protein Sequences.** Version 2: March 2007.

22.- Database of Collagen Mutations (www.le.ac.uk/genetics/collagen).

23.- Online Mendelian Inheritance in Man. (+120150) **Collagen type 1, Alpha 1 gene: COL1A1.**

24.- Online Mendelian Inheritance in Man. (*120160) **Collagen type 1, Alpha 2 gene: COL1A2.**

25.-Rebecca Pollitt, Robert McMahon, Janice Nunn, Robert Bamford, Amal Afifi, Nicholas Bishop, and Ann Dalton. **Mutation Analysis of COL1A1 and COL1A2 in Patients Diagnosed With Osteogenesis Imperfecta Type I-IV.** Human Mutation, mutation in brief #901 (2006) online

26.- Liat Ries-Levavi, Tsofia Ish-Shalom, Moshe Frydman, Dorit Lev, Shirley Cohen, Gad Barkai, Boleslaw Goldman, Peter Byers, and Eitan Friedman. **Genetic and Biochemical Analyses of Israeli Osteogenesis Imperfecta Patients.** Human Mutation, mutation in brief #701 (2004) online.

27.- Lodish Harvey, Berk Arnold, Matsudaira Paul, Kaiser Chris A., Krieger Monty, Scott Matthew P., Zipurski S. Lawrence, Darnell James. **Principales eventos en la biosíntesis de colágeno fibrilar.** Biología Celular y Molecular. 5a edición. Editorial Panamericana. Junio 2006. P-217.

28.-Kwang-Soo Lee, Hae-Ryong Song, Tae-Joon Cho, Hyon J. Kim, Tae-Mi Lee¹, Hyun-SeokJin, Hyun-Young Park, Seongman Kang, Sung-Chul Jung, and Soo Kyung Koo. **Mutational Spectrum of Type I Collagen Genes in Korean Patients With Osteogenesis Imperfecta.** Human Mutation, Mutation in Brief #894 (2006) Online.

29.-Venturi G. Tedeschi E. Mottes M, Valli M, Camilot M, Viglio S, Antoniazzi F, Tató L. **Osteogenesis imperfecta : clinical, biochemical and molecular findings.** Clinical genetics 2006; vol 70: 131-139.

30.- Tim Cundy, Anne Horne, Mark Bolland, Greg Gamble, and James Davidson. **Bone Formation Markers in Adults with Mild Osteogenesis Imperfecta.** *Clinical Chemistry* 53:6, 1109–1114 (2007).

31.- L.M. Ward, L. Lalic, P.J. Roughley, and F.H. Glorieux. **Thirty-three Novel COL1A1 and COL1A2 Mutations in Patients With Osteogenesis Imperfecta Types I-IV.** *Human Mutation*, mutation in brief #414 (2001) online.