



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS
ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD**

TITULO:

**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN CPK1 EN UN GRUPO
DE PACIENTES CON PICNODISOSTOSIS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRO
(CIENCIAS MEDICAS)**

Presenta:

Drusso López Estrada

Tutor:

Dra. en C. Margarita Valdés Flores

Ciudad de México, D.F. Agosto del 2012



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.

Índice

Resumen	3
Antecedentes	4-16
Justificación	17
Planteamiento del problema	17
Objetivos	17
Hipótesis	17
Material y métodos	18-19
Resultados	20-27
Discusión	28-29
Conclusiones	30
Índice de tablas y figuras	31
Referencias	32-38

Resumen

La picnodisostosis es un raro desorden del metabolismo óseo que se hereda en forma autosómica recesiva. Se caracteriza por la presencia de talla baja, deformidades craneales, hipoplasia clavicular y fragilidad ósea. Radiológicamente se presenta incremento en la densidad ósea, osteoesclerosis y acro-osteolisis, sobre todo en falanges distales. Análisis de ligamiento sugieren que el gen relacionado con esta enfermedad se ubica en 1q21 y codifica para una proteína con actividad de cistein-proteasa lisosomal conocida como catepsina K. Esta juega un papel importante en el metabolismo óseo, particularmente en el proceso de resorción. En el presente trabajo se analizan clínicamente, radiológicamente y desde el punto de vista molecular a un grupo de 6 de pacientes mexicanos con ésta enfermedad, dos casos esporádicos y cuatro de presentación familiar (dos familias con dos casos cada una). En una de las dos familias analizadas el estudio molecular reveló la presencia de una transversión (G/T) en el exón 5, lo que ocasiona el reemplazo de un residuo de Glycina por Arginina (GGT/CGT), (G146R) en la posición 146 de la proteína catepsina K, los dos casos de esta familia que fueron analizados mostraron dicha alteración.

Antecedentes

La picnodisostosis también conocida como enfermedad de Toulouse-Lautrec es una osteocondrodisplasia poco común que presenta un patrón de herencia autosómico recesivo. La primera descripción clínica de esta entidad fue atribuida a Montanari en 1923, sin embargo, las características clínicas más importantes fueron delineadas simultáneamente por Andrén et al y por Maroteaux and Lamy et al en 1962, estos últimos especularon que el reconocido pintor francés Henri de Toulouse-Lautrec (Albi 1864/Malromé, Burdeos 1901), sufría de esta enfermedad (1-4). Incluso, el término de picnodisostosis con el cual se conoce a esta enfermedad, fue acuñado por Maroteaux y Lamy, y deriva de la palabra griega “pyknos,” que significa denso y la palabra compuesta “disostosis” que significa formación anormal de hueso, de tal forma que el nombre hace alusión al aumento en la densidad aumentada del hueso, que caracteriza a esta rara entidad clínica. Las fotografías 1-4 corresponden a imágenes del pintor en diferentes momentos de su vida, en ellas se aprecia como discretamente sus rasgos faciales van modificándose a través del tiempo, en la fotografía 4 empieza a ser más evidente el engrosamiento de los labios, mientras que en las fotografías 5-7 son mucho más evidentes otras características fenotípicas presentes en la enfermedad. Los cuadros 1 y 2 que corresponden a pinturas de la época, el primero es de Toulouse Lautrec a los 19 años, realizado por el pintor René Princetau y el segundo a un fragmento de la parodia del cuadro “El Bosque Sagrado” pintado por Lautrec en 1884, con autorretrato del pintor de espaldas en donde destaca su corta estatura y la deformidad de su cuerpo (3,5).



Fotografía 1



Fotografía 2



Fotografía 3



Fotografía 4

Imágenes del pintor en diferentes momentos de su vida.



Fotografía 5
En una de sus clásicas fotografías pueden observarse su corta estatura así como los hombros caídos, debido posiblemente a alteraciones claviculares.



Fotografía 6
De perfil, se puede apreciar la hipoplasia mandibular.



Fotografía 7
En esta fotografía de frente Se observan los labios gruesos e hipoplasia del mentón.



Cuadro 1
Retrato de Toulouse Lautrec a los 19 años.
Realizado por René Princetau



Cuadro 2
Fragmento de la parodia del cuadro
del cuadro "El Bosque Sagrado" pintado por
Lautrec en 1884, con autorretrato del pintor, de
espaldas en donde destaca su corta estatura y la
deformidad de su cuerpo.

Este desorden ha sido reportado en pacientes de diferentes grupos étnicos y con frecuencia se documenta la consanguinidad (más del 30% de los casos), no obstante, hasta la fecha no ha sido posible establecer la frecuencia aproximada con la cual se presenta esta enfermedad, sin embargo, ha sido informada a través de diversos reportes de casos en poblaciones de todo tipo (árabes, japoneses, portugueses, mexicanos, etc.) (7-9).

El espectro fenotípico de esta entidad es amplio pero también muy característico e incluye; talla baja, hipoplasia clavicular y deformidades craneales secundarias al retardo o ausencia en el cierre de las suturas craneales. Algunas veces se observa nariz prominente, microretrognatia y anomalías dentales que incluyen; retardo en la erupción dental, anodoncia parcial e infecciones periodontales frecuentes. Se aprecia también aumento en la densidad y fragilidad ósea, lo que favorece la presencia de fracturas aún ante traumatismos muy leves, clásicamente se presenta acro-osteolisis de falanges distales. En algunos casos se ha observado retraso en el cierre de suturas craneales sobre todo las suturas lambdoidea y sagital, pérdida del ángulo

mandibular e hipoplasia clavicular. Esporádicamente algunos pacientes han presentado características poco comunes como son; defectos en la secreción de hormona del crecimiento, craneosinostosis, artritis erosiva, osteomielitis mandibular, pseudoartrosis clavicular, espondilólisis, anemia y quiste porencefálico (10-22). Estas características clínicas se resumen por sistemas en la tabla 1.

Tabla 1. – Características fenotípicas de la picnodisostosis (10-22)

<i>I.- Sistema músculo-esquelético</i>	Talla baja. Hipoplasia clavicular, incluso ausencia de su extremo acromial. Aumento en la densidad y fragilidad ósea. Fracturas recurrentes. Acro-osteolísis de falanges distales.
<i>II.- Estructuras cráneo-faciales</i>	Retraso en el cierre de suturas craneales. Nariz prominente. Hipoplasia mandibular, microretrognatia. Proptosis ocular. Pérdida del ángulo mandibular. Osteomielitis mandibular. Retardo en la erupción dental. Anodoncia parcial e infecciones periodontales frecuentes.
<i>III.-Otras alteraciones</i>	Displasia ungueal. Artritis erosiva. Osteomielitis mandibular. Pseudoartrosis clavicular. Espondilólisis.
<i>IV.- Asociaciones esporádicas</i>	Defectos en la secreción de hormona del crecimiento. Craneosinostosis. Anemia. Quiste porencefálico.

Características radiológicas

En esta enfermedad, en el examen radiológico se observa una clara osteoesclerosis generalizada similar a la observada en la osteopetrosis, sin embargo, en la picnodisostosis el canal medular permanece permeable y puede visualizarse en prácticamente todos los pacientes, no así en la osteopetrosis. Pueden apreciarse clavículas delgadas y con hipoplasia en sus terminaciones externas, en ocasiones incluso con ausencia de su extremo acromial. En algunas ocasiones existe aplasia de los arcos costales, en la columna pueden ocurrir espondilolistesis en la región lumbosacra así como defectos en la segmentación atloaxoidea. El modelado de los huesos largos

es anómalo debido al adelgazamiento de las corticales, las fracturas ocurren sobre todo en la adolescencia y en la vida adulta, suelen ser recurrentes y en los adultos mayores son generalmente más graves. La acroosteolisis de falanges distales de manos y pies es una característica radiológica de la enfermedad. En el cráneo la imagen radiológica clásica da la impresión de antifaz, debido a la esclerosis que pueden presentar los huesos propios de la nariz y la falta de neumatización de los senos paranasales. Las fontanelas permanecen abiertas y pueden presentarse defecto del hueso hioides (10, 21, 23, 24).

Alteraciones ultraestructurales

El análisis del tejido óseo de estos pacientes demuestra una estructura trabecular anormal y desordenada con poco alineamiento de los cristales de mineral en el eje longitudinal de las fibras de colágeno. Es el exceso en la trabeculación del espacio medular lo que ocasiona una pobre respuesta a las demandas biomecánicas que se ejercen sobre el hueso, ocasionando así la característica fragilidad ósea, lo que se traduce en una incidencia mayor de fracturas. Las corticales suelen estar engrosadas, con franjas de matriz desmineralizada en la superficie del hueso, debido al déficit de la proteólisis. Los osteoclastos se muestran defectuosos con grandes vacuolas de colágeno que no es digerido debido a que la proteína involucrada en la fisiopatología de la enfermedad (catepsina K) no ejerce su función. Mediante microscopía electrónica se pueden observar las partículas minerales aumentadas y mal alineadas debido a una mala orientación de las fibras de colágeno (25).

Cambios bioquímicos

Los pacientes con esta enfermedad suelen presentar concentraciones disminuidas del telopéptido carboxilo terminal del colágeno I, esto se debe a la imposibilidad de hidrolizar el colágeno I. La fosfatasa ácida tartrato resistente y las concentraciones de propéptido C-terminal del colágeno I así como la osteocalcina suelen ser normales (26).

Aspectos genéticos

Esta enfermedad presenta una forma de herencia autosómica recesiva y aproximadamente en el 30% de los casos se ha documentado consanguinidad. Gracias a estudios de análisis de ligamiento de dos casos familiares uno de origen árabe en el cuál se documentaron 11 matrimonios consanguíneos en el árbol genealógico y el otro de pacientes mexicanos, con 4 matrimonios consanguíneos detectados en el análisis familiar se localizó en el genoma humano al gen relacionado con esta enfermedad (27, 28). Este gen se conoce como gen CTSK, se ubica en los brazos largos del cromosoma 1 (1q21), tiene 7 exones y se expande sobre una región de 12 kb. El codón correspondiente a la metionina que marca el sitio de inicio de transcripción se ubica en el exón 2 mientras que el de término se localiza en el exón 7. El gen produce un transcrito de 1.7-kb y su cDNA predice una proteína de 314 residuos de aminoácidos, incluye una pre región de 15 aminoácidos, una pro región de 99 y un péptido maduro de 215 residuos en la forma activa de la enzima, en la figura 1 se representa la estructura y organización del gen y en la tabla 2 se presenta la secuencia de sus exones. Su producto cuenta con dos sitios potenciales de N-glicosilación, uno en la preregión (Asn88p) y otro más en la enzima madura (Asn99), el segmento N-terminal de la pre región consiste en tres α -hélices y la pro región participa en los contactos Van der Waals de la enzima, cabe mencionar que la preprocatepsina guarda una homología de más del 50% con las

catepsinas humana “S” (CTSS) y la catepsina “L” (CTSL) (29-31).

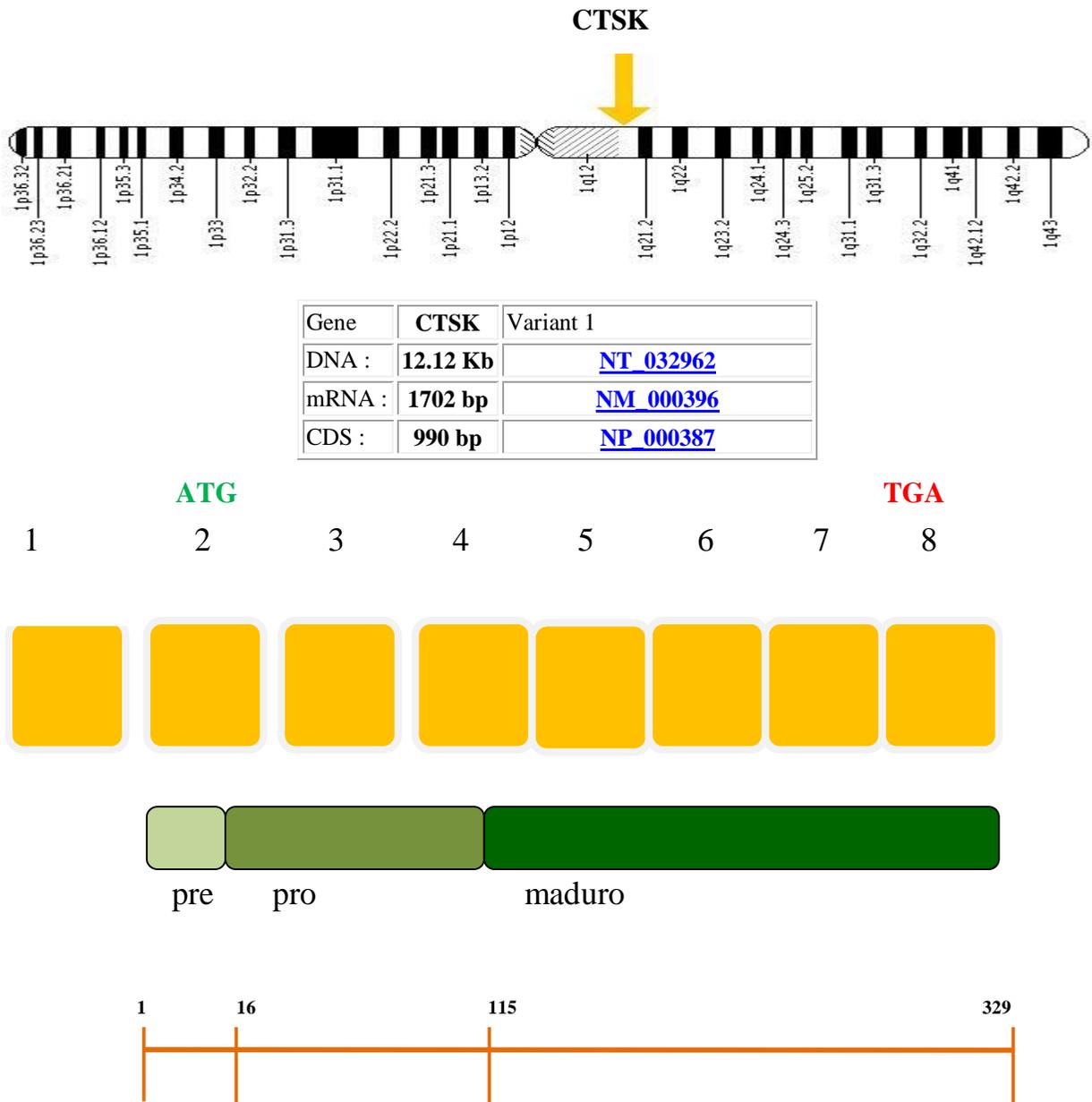


Figura 1.- Organización del gen CTSK y su producto.

Tabla 2.- Secuencia de exones e intrones del gen CTSK

EXON 1 123 bp

agatattgaggtcttgtattgccaccaagacagcttctgtgagactaaatgctagtaattccctaccctggcacacatgctgcatacacagaaactgcaaatccaactgcctcctcctcctcctaccctcctctcagcaattctatccccgc
 ctctcctcttacc
 AAATTTTCCAGCCGATCACTGGAGCTGACTTCCGCAATCCCGATGGAATAAATCTAGCACCCCTGATGGTGTGCCACACTTTGCTGCCGAAACGAAG
 CCAGACAACAGATTTCCATCAGCAG
 gtaacgttgaactcctagatcttttagctttcattcctgtcaattcctctgagtaftaggatgtagtactgagatcacataaacttttagcctctgcagatgaaacagagatgcaactcttagctcctgctaaataaaactcctggaatc
 ttagaattcct

EXON 2 121 bp

ccccctagatcaaatgcttgaaccagatgtaccagatcctatctaaacacagcccctcctgactatcattgtttatcaccttttccgtactcttctcctataaagcctagtttcctctgttccctgcaaatggaagatttccctaactaca
 ttctctgcag
 GATGTGGGGGCTCAAGGTTCTGCTGCTACCTGTGGTGAGCTTTGCTCTGTACCCTGAGGAGATACTGGACACCCACTGGGAGCTATGGAAGA
 AGACCCACAGGAAGCAATATAACAACAAG
 gtgctggggtcctggaggggcatggcaggaaggtgagacctgagctctctcttctcctcaatcctcaatgctttatcctcaagcaaatcagctcctcctcctcaactcatgttaacatagctttcctcctatgctcaatca
 tctctgtcaactg

EXON 3 123 bp

tttgggtgattgtttacatattatctctctcagcgtcttaattccatggtagttcccccaactaaactgaaactttatgattgtagtttctttctcctaaaacccctcacaataattacatataactgtagacagctctacaagactgactatgcttgg
 ttag
 GTGGATGAAATCTCTCGGCGTTAATTTGGGAAAAAAACCTGAAGTATATTTCCATCCATAACCTTGAGGCTTCTCTTGGTGTCCATACATAT
 GAACTGGCTATGAACCACTGGGGACATG
 gcaagtatactcagctcctgtcccactgcaccattgctttgctcctgctgatcctggcctcttctcttctgcttagaccagtgaagaggtggttcagaagatgactggactcaaatgacctgtctcctccagtaatgacacctttatc
 ccgaatgggaagg

EXON 4 156 bp

gggaaaaaacctgaagtatttccatccataacctgagcctctcttgggtccatcacatgaactggctatgaaccacctggggacatggcaagtatagctcagctcctgtcccactgcaccattgctttagttccctgctgatgctggcctct
 ttctcttctcttag
 ACCAGTGAAGAGGTGGTTCAGAAGATGACTGGACTCAAAGTACCCCTGTCTCATTCCCGCAGTAATGACACCCTTTATATCCAGAAATGGGA
 AGGTAGAGCCCAGACTCTGTGCGACTATCGAAAGAAAAGGATATGTTACTCCTGTCAAAAATCAG
 gtaactccttctctgggtgctatgtaactggcattgctcttctctgctgcttctgaggtgaaaggcaccagaaaaagggcaaggaaatgagtaactcctcccaattccattctgttattaacctcattgtttctgtacattgggt
 gtttctggt

EXON 5 219 bp

tagcaaaaatcaatagcagtagaagcagtgcaacagatattagcggaaagggaagactacaacaatgacaactttgctgaaatfttgaacacatggaatttctcagcaggtagagagagatagaaaaatgaaacagcaagattgata
 gttctctgtatgctttcag
 GGTCACTGTGGTTTCTGTTGGGCTTTTAGCTCTGTGGGTGCCCTGGAGGGCAACTCAAGAAGAAAACCTGGCAACTCTTAAATCTGAGTCC
 CCAGAACCTAGTGGATTGTGTGTCTGAGAATGATGGCTGTGGAGGGGGCTACATGACCAATGCCCTTCCAATATGTGCAGAAGAACCAGGGTA
 TTGACTTGAAGATGCCATCCCATATGTGGGACAG
 gtgagattgctccacaaatatacagctctgttggctcctcctcccagcagatgattgtactggaacaattccagaataactgtttctgtatcctcctgcttctgaggaataattcccacagaaggccaaaggaattccacaactgggga
 attaggagcct

EXON 6 166 bp

aagcgggaatcctcttcatattctttttctgaggaagaacagacctctctgaaacccctgactgctcctctgttagttctcactggcactcaatcaatattggtgatttcttactcactgactcattgctattgcttctcactgcttacaactctg
 ttctccag
 GAAGAGAGTGTATGTACAACCAACAGGCAAGGCAGTAAATGCAGAGGGTACAGAGAGATCCCCGAGGGGAATGAGAAAGCCCTGAAGA
 GGGCAGTGGCCGAGTGGGACCTGTCTCTGTGGCCATTGATGCAAGCCTGACCTCCTTCCAGTTTTACAAAAAG
 gtaagaagctgctgatcctatagcagcactgcttttatgatacaactgaggtttctcgaagacctgggtatcttctcagtaactgattttgtattcacatggaggtgccaagagaagaattacaactgctcagatgagcaacatctctgtgtaac
 cctcctgacagcagat

EXON 7 106 bp

ttttgattcacatggaagtgccagagagaataaacaactgctgagatggagcagcactctgtgtaaacctcctgacacggatggaattcttcaaacagctcctcactgctggaatcccacaggtgaccttgattgcatagagcctcac
 gctggtagttgattctag
 GTGTGTATATGATGAAAGCTGCAATAGCGATAATCTGAACCATGCAGTTTTGGCAGTGGGATATGGAATCCAGAAGGGAAACAAGCACTGG
 ATAATTAACCAACAG
 gtaatgagggaaactactttgttattcagctcaccctttaaactcaactcaactcactcagctcctccagatattcttctgctcccaaatcaagaaaaattatctcagagttctcacttctctcctcagtcagagctcttaattctcagctgacacttaag
 gccagtggt

EXON 8 688 bp

ccctccttgatactacagatattgcttctcccttctgactttaaactttaaagttaaaacatcatattctttgtgtaccatcagtaacctgcacaatactcagtaaatattttaaataaataaactgagagtaactaagtattttctgattgctc
 ttacag
 CTGGGGAGAAAACCTGGGAAACAAAGGATATATCCCTATGGCTCGAAAATAAGAACAACGCCCTGTGGCATTGCCAACCTGGCCAGCTTCCCCA
 AGATGTGACTCCAGCCAGCCAAATCCATCCTGCTCTTCAATTTCTCCACGATGGTGCAGTGTAAACGATGCACTTTGGAAGGGAGTTGGTGTGCTATTT
 TTGAAGCAGATGTGGTGATAGACTGAGATTGTCTGTTCACTTTCCCATTTGTTGTGCTTCAAATGATCCTTCTACTTTGCTTCTCCACCCATGACCTT
 TTCACTGTGGCCATCAGGACTTTCCCTGACAGCTGTGTACTCTTAGGCTAAGAGATGTGACTACAGCCTGCCCTGACTGTGTTGTCCAGGGCTGAT
 GCTGTACAGGTACAGGCTGGAGATTTTACATAGGTTAGATTCTCATTACGGGACTAGTTAGCTTTAAGCACCCCTAGAGGACTAGGGTAATCTGACT
 TCTACTTCTAAAGTTCCCTTCTATATCCTCAAGGTAGAAATGTCTATGTTTTCTACTCCAATTCATAAATCTATTCAATAGTCTTTGGTACAAGTTTAC
 ATGATAAAAAG
 AAATGTGATTTGTCTTCCCTTCTTTGCACTTTTGAATAAAGTATTTATCTCCTGTCTACAGTTTAAATAATAGCATCTAGTACACAT
 tcatcttggtagactgtgtagtgctgaggaagaaatgaaatagaacatctctatgactgagcgtcagctggtgttagagactgtcacataaaccttcccaattcattttgtcattcctcagcaaatatattgagttctactct
 gtgccaaga

Mutaciones en el gen CTSK y Picnodisostosis

En cuanto a las mutaciones reportadas en este gen, se ha observado que son predominantemente de tipo puntual, se distribuyen a lo largo del gen y aparentemente no existen puntos de mayor susceptibilidad. En la tabla 3 se muestran los resultados de un trabajo de revisión reciente de Yang Xue y colaboradores sobre de picnodisostosis, a la fecha no se ha establecido una correlación genotipo-fenotipo y en la figura 4 se presentan las mutaciones caracterizadas en el gen CTSK en pacientes con picnodisostosis, esto de acuerdo a la revisión publicada recientemente por Yang Xue et al., y en la figura se aprecia la clasificación de estas mutaciones de acuerdo a su efecto así como su ubicación en el producto del gen (32-38).

Tabla 3.- Mutaciones caracterizadas en el gen CTSK como causa de picnodisostosis.

Tomada de: *Clinical and animal research findings in pycnosystosis and gene mutations of cathepsin K from 1996 to 2011. Yang Xue et al. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2011, 6:20.*
[http://www.ojrd.com/content/6/1/20.](http://www.ojrd.com/content/6/1/20)

Location in DNasequence	Genomic DNA sequence variants	Coding DNA sequence variants	Effect on aminoacid	Location in protein sequence	First description
Missense					
Exon 2	g.1551T > C	c.20T > C	p.Leu7Pro	Pre	Donnarumma, et al.,2007
Exon 2	g.1557T > C	c.26T > C	p.Leu9Pro	Pre	Nishi, et al., 1999
Exon 3	g.2128C > T	c.136C > T	p.Arg46Trp	Pro	Schilling, et al., 2007
Exon 3	g.2227G > A	c.235G > A	p.Gly79Arg	Pro	Fratzl-Zelman, et al.,2004
Exon 3	g.2228G > A	c.236G > A	p.Gly79Glu	Pro	Hou, et al., 1999
Exon 5	g.4120C > T	c.422C > T	p.Ala141 Val	Mature	Chavassieux, et al.,2008
Exon 5	g.4134G > C	c.436G > C	p.Gly146Arg	Mature	Gelb, et al., 1996
Exon 5	g.4192A > G	c.494A > G	p.Gln165Arg	Mature	Donnarumma, et al.,2007
Exon 5	g.4258A > C	c.560A > C	p.Gln187Pro	Mature	Li, et al., 2009
Exon 5	g.4278G > A	c.580G > A	p.Gly194Ser	Mature	Donnarumma, et al.,2007
Exon 6	g.8644A > G	c.635A > G	p.Tyr212Cys	Mature	Hou, et al., 1999
Exon 6	g.8737 G > A	c.728G > A	p.Gly243Glu	Mature	Khan et al., 2010
Exon 6	g.8755T > C	c.746T > C	p.Ile249Thr	Mature	Donnarumma, et al.,2007
Exon 6	g.8758A > G	c.749A > G	p.Asp250Gly	Mature	Donnarumma, et al.,2007
Exon 7	g.9109C > T	c.830C > T p.	Ala277Val	Mature	Gelb, et al., 1998
Exon 7	g.9109C > A	c.830C > A	p.Ala277Glu	Mature	Hou, et al., 1999
Exon 7	g.9171T > C	c.892T > C	p.Trp298Arg	Mature	Nishi, et al., 1999
Exon 8	g.9186G > A	c.908G > A	p.Gly303Glu	Mature	Toral-Lopez et al.,2010
Exon 8	g.11474T > C	c.926T > C	p.Leu309Pro	Mature	Haagerup, et al.,2000
Exon 8	g.11479G > C	c.931G > C	p.Ala311Pro	Mature	Nishi, et al., 1999
Exon 8	g.11482C > G	c.934C > G	p.Arg312Gly	Mature	Hou, et al., 1999
Exon 8	g.11501G > A	c.953G > A	p.Cys318Tyr	Mature	Bertola et al., 2010
Exon 8	g.11503G > T	c.955G > T	p.Gly319Cys	Mature	Donnarumma, et al.,2007
Nonsense					
Exon 3	g.2146A > T	c.154A > T	p.Lys52X	Pro	Hou, et al., 1999
Exon 5	g.4266C > T	c.568C > T	p.Gln190X	Mature	Hou, et al., 1999
Exon 6	g.8730C > T	c.721C > T	p.Arg241X	Mature	Gelb, et al., 1996
Frameshifts (duplication)					
Exon 2	g.1591-1592	dupGA c.60_61dupGA	p.Ile21 ArgfsX29	Pro	Donnarumma, et al.,2007
Exon 4	g.2359	dupA c.282dupA	p.Val95SerfsX9	Pro	Donnarumma, et al.,2007
Frameshifts (deletion)					
Exon 3	g.2230delG	c.238delG	p.Asp80ThrfsX2	Pro	Fratzl-Zelman, et al.,2004
Exon 5	g.4124delT	c.426delT	p.Phe142LeufsX19	Mature	Fujita, et al., 2000
Splicing					
Intron2	g.2112G > A	c.121-1G > A	p.del41Val-81Met	Pro	Haagerup, et al.,2000
Exon 7	g.9169G > A	c.890G > A; 785_890del	p.Gly262AlafsX70	Mature	Donnarumma, et al.2007
Stop codon					
Exon 8	g.11538A > G	c.990A > G	p.X330TrpextX19	Mature	Gelb. et.al., 1996

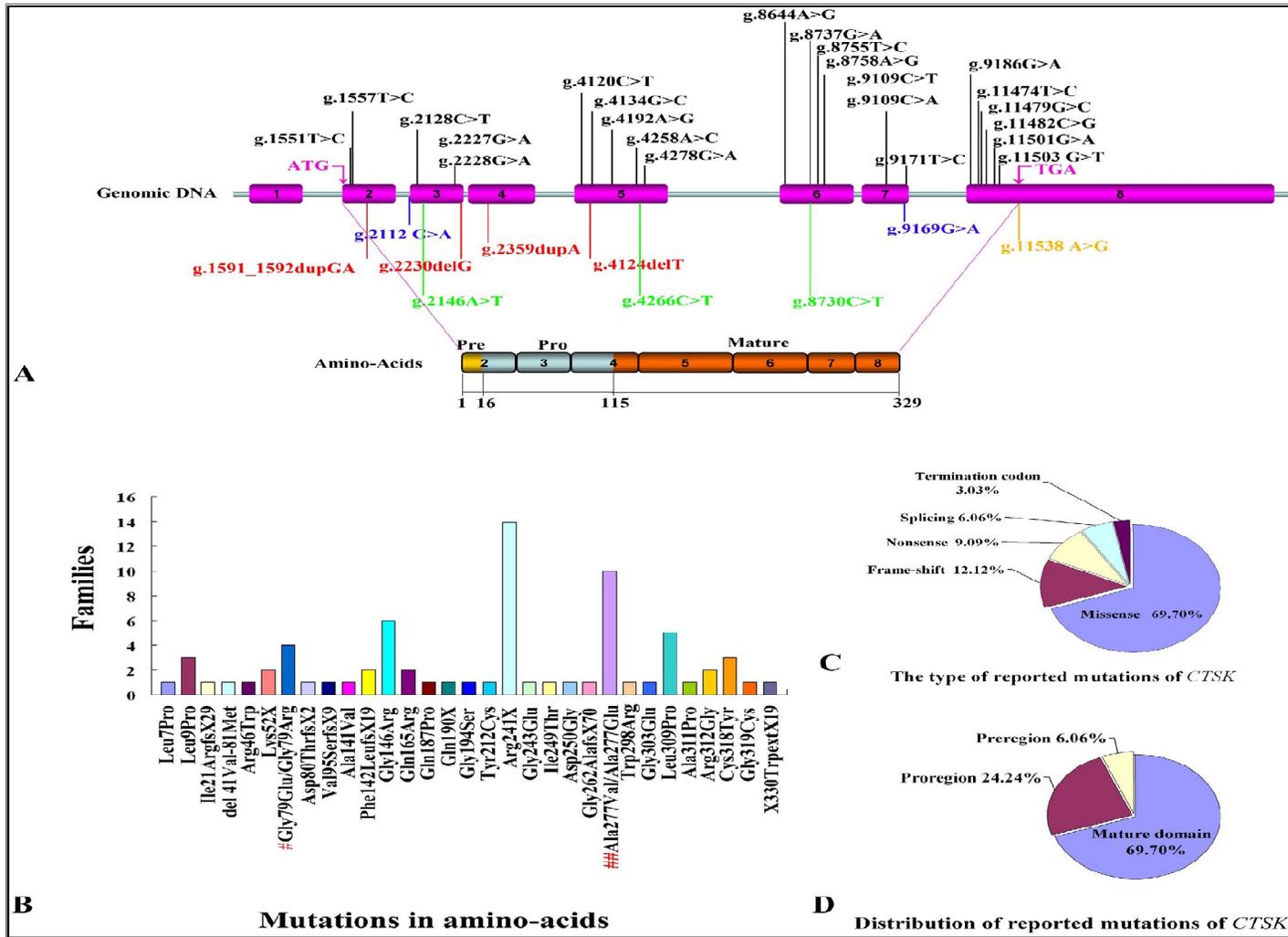


Figura 4. - Mutaciones caracterizadas en el gen CTSK como causa de picnodisostosis, con relación al tipo de cambio y la región correspondiente en el producto génico.

Tomada de: *Clinical and animal research findings in pycnosystosis and gene mutations of cathepsin K from 1996 to 2011*. Yang Xue et al. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2011, 6:20. <http://www.ojrd.com/content/6/1/20>.

Figure 1 Reported mutations of CTSK. (A) Distribution of the CTSK gene and polypeptide mutations. The genomic structure of the CTSK gene with 8 exons (purple boxes numbered 1-8) is shown in the top half. The bottom half illustrates the schematic representation of the polypeptide comprising a 15-amino acid preregion (yellow box), a 99-residue proregion (light blue boxes), and a 215-amino acid mature domain (orange boxes). A total of 23 missense mutations (black type) are represented at the top of the gene diagram, while frame-shift mutations (red type), nonsense mutations (light green type), splicing mutations (blue type), and termination codon mutations (yellow type) are at the bottom. (B) Frequency of different mutations. The height of each bar represents the number of afflicted families. #: Both mutations in the Glu70 residue. Both mutations in the Ala277 residue. (C) The type of reported CTSK mutations. The mutations reported in pycnodysostosis patients consist of 23 missense

mutations, 4 frame-shift mutations, 3 nonsense mutations, 2 splicing mutations, and 1 termination codon mutation. (D) Distribution of reported CTSK mutations. A total of 69.70% of the mutations occurred in the mature domain, 24.24% in the proregion, and 6.06% in the preresion.

Catepsina K

La catepsina K es una proteína de tipo enzimático que presenta actividad de cistein-proteasa lisosomal y participa en procesos de activación de proenzimas a enzimas maduras, presentación de antígenos, maduración hormonal, pero sobre todo juega un papel importante en la resorción y remodelamiento óseo. Su RNAm se ha detectado en osteoclastos y osteoclastomas, siendo su expresión muy baja en corazón, pulmón, músculo esquelético, colon, ovario y placenta. Es importante mencionar que en condiciones normales en el tejido óseo ocurren ciclos de remodelado, debido a la constante interacción entre osteoblastos y osteoclastos, los primeros producen una nueva matriz ósea mientras que segundos la reabsorben. Sabemos que las cisteína proteasas y más específicamente, la catepsina K interviene en la degradación de la matriz proteica, ya que digiere las proteínas colagenas, las cuales representan hasta el 90% de los componentes de la matriz del hueso. La figura 5 muestra la estructura tridimensional de la proteína y su secuencia de aminoácidos (39-44).

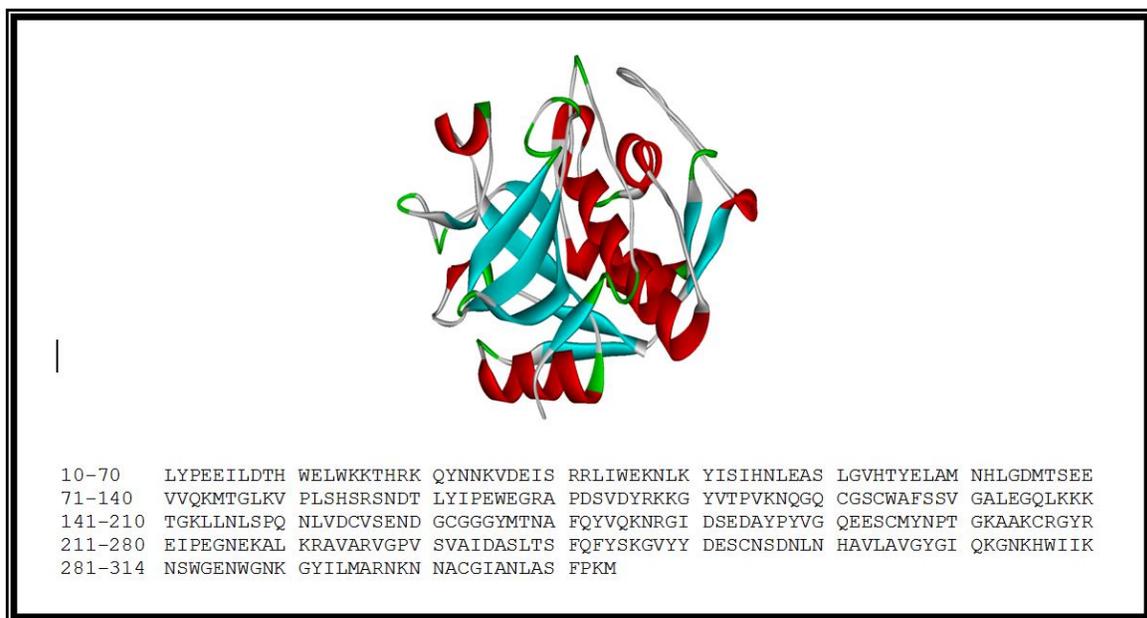


Figura 5 muestra la estructura tridimensional de la proteína y su secuencia de aminoácidos.

Justificación

La picnodisostosis es una displasia ósea relativamente común, que representa uno de los motivos de atención en el área de traumatología debido a la ocurrencia de fracturas. Su manejo suele ser diferente al manejo tradicional debido a las particularidades ortopédicas de la enfermedad. Pocos casos se han estudiado en nuestro país desde el punto de vista molecular, por lo que desconocemos si en nuestra población existe un patrón de mutaciones característico.

Pregunta de investigación

Analizar la secuencia del gen CTSK en 6 pacientes con diagnóstico clínico y radiológico compatible con picnodisostosis.

Objetivo

Conocer la secuencia de pares de bases del gen CTSK que presentan 6 pacientes con diagnóstico clínico y radiológico de picnodisostosis, esto con el fin de identificar el defecto molecular en cada caso.

Tipo de investigación

Descriptiva

Hipótesis

La secuencia del gen CTSK en los pacientes con picnodisostosis es diferente (presenta mutaciones) en comparación con los individuos que no presentan la enfermedad (controles sanos).

Procedimiento

Captación de los casos:

Los pacientes se captaron en los Servicios de Genética del Instituto Nacional de Ortopedia y del Hospital General de México y se les invitó a participar en el estudio mediante un formato de consentimiento informado. En todos los participantes se elaboró una historia clínica detallada, en la que se incluyeron un interrogatorio intencionado con relación a los antecedentes heredofamiliares de la entidad así como de la sintomatología propia de éste desorden. Se realizó un examen clínico detallado con el fin de documentar el mayor número de datos clínicos característicos de la enfermedad. En todos los participantes se efectuó un estudio radiológico y en una de las familias fue posible la evaluación de la densidad mineral ósea mediante densitometría de cadera y columna vertebral, en todos los participantes se efectuó además un análisis auditivo.

Posteriormente, se procedió a la obtención de 6-8ml de sangre venosa periférica con el fin de obtener una muestra de ADN genómico de cada uno de ellos para la realización del estudio molecular.

Estudio molecular

El ADN se extrajo de leucocitos de sangre periférica conforme a procedimientos estándar y después mediante PCR convencional se amplificaron los 7 exones del gen CTSK (2-8) empleando para este fin oligonucleótidos específicos. Cada reacción de amplificación de PCR de 50 µl contenía lo siguiente; buffer 1X, 100-200 ng de DNA genómico, 0,2 mM de cada dNTP, 2U de Taq polimerasa, 1 mM de oligonucleótidos (directo e reverso) y entre 1-3 mM de MgCl₂.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa 1.5% y las bandas obtenidas se purificaron con la ayuda del kit Qiaex II (Qiagen) y finalmente, el análisis de las secuencias se realizó empleando el kit BigDye Terminator (Applied Biosystems) con un 10 ng de plantilla de ADN en cada reacción. Los productos finales fueron analizados por secuenciación en un analizador genético automatizado ABI Prism 310 (Applied Biosystems), siempre en cada procedimiento se incluyó un control negativo.

Resultados

Presentación de los casos

Se trata de un grupo de 6 pacientes mestizos mexicanos, de quienes se obtuvo el consentimiento informado para su participación. Las edades de los pacientes oscilaron entre 8 a 53 años e incluyeron 2 casos de presentación esporádica (pacientes 1 y 2) y cuatro casos de presentación familiar (3A, 3B y 4A, 4B), es decir dos familias no relacionadas entre sí. Los árboles genealógicos correspondientes a cada familia se representan en las figuras 6 y 7. Es importante mencionar que tal y como se observa en la figura 6 en el caso 3 se documentó consanguinidad, se trata de una familia originaria de una población geográficamente asilada en Oaxaca.

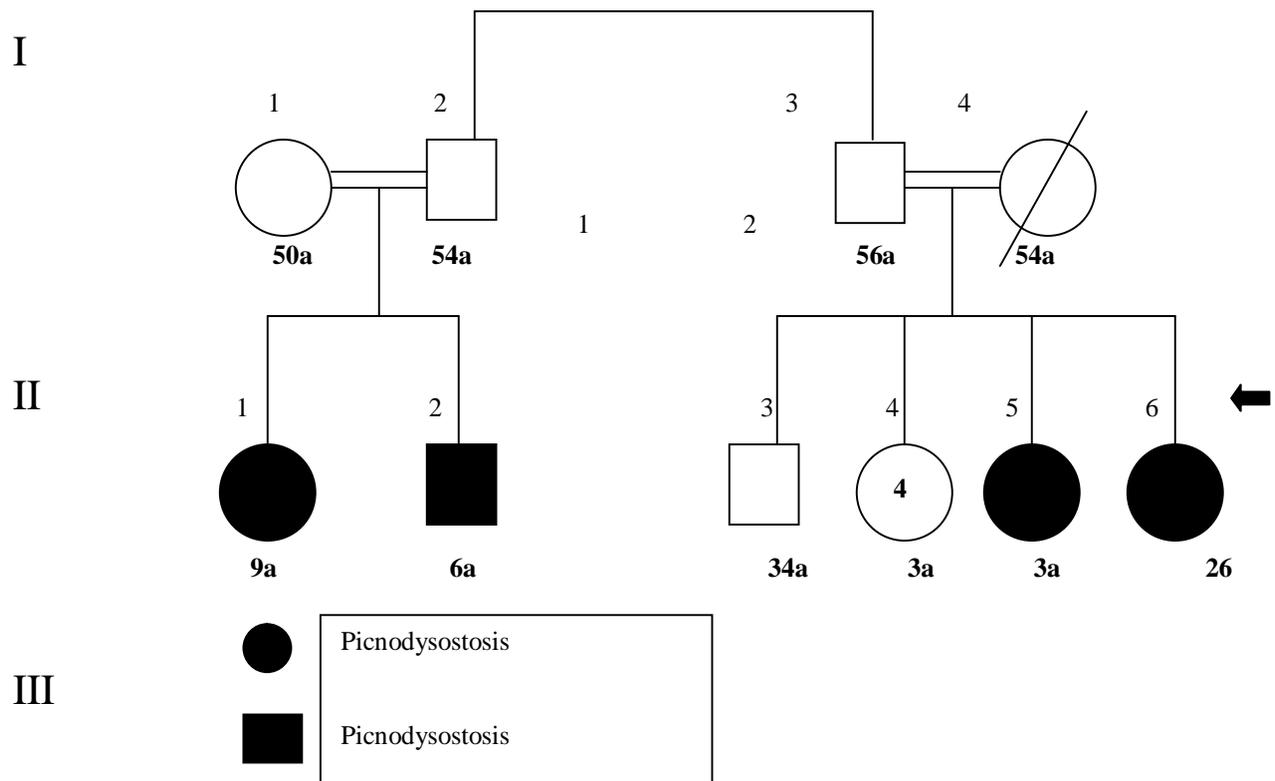


Figura 6. Genealogía del caso número 3

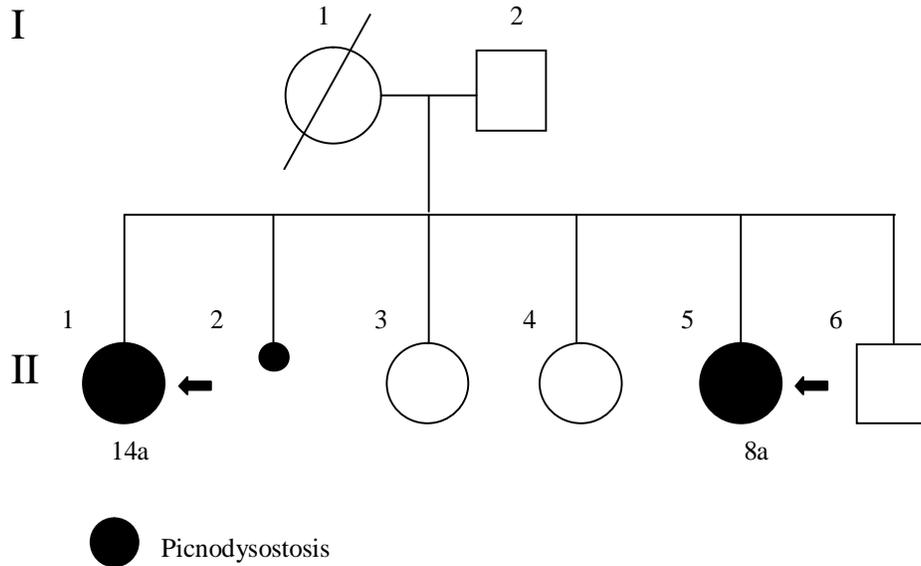


Figura 7. Genealogía del caso número 4

En la tabla se concentran las características clínicas y radiológicas que se detectaron en cada uno de los casos, en donde podemos apreciar que existen algunas características clínicas presentes en el 100% % de los casos, entre ellas talla baja, hipoplasia mandibular, proptosis ocular, escleras azules, nariz prominente, retraso en la erupción dental, mala posición dental con hipoplasia del esmalte, braquidactilia de manos y pies y distrofia ungueal. Debemos mencionar que la historia de fracturas sólo se observó en los pacientes 1,2 y 3A y no así en el resto (casos 3B, 4A y 4B), sin embargo, los tres primeros casos corresponden a pacientes de 53, 40 y 26 años de edad, mientras que los segundos son pacientes mucho más jóvenes (9, 14 y 8 años). La fotografía #1 muestra a la paciente 4B, en el pie de imagen se destacan las características faciales que presenta la paciente.

Tabla 4. Características clínicas y radiológicas de los pacientes estudiados.

Características Clínicas	Pac. 1	Pac. 2	Pac. 3A	Pac. 3B	Pac. 4A	Pac. 4B
Género	Masc	Fem	Fem	Fem	Fem	Fem
Edad	53	40	26	9	14	8
Presentación	Esp.	Esp.	Fam.	Fam.	Fam.	Fam.
Consanguinidad	No	No	Sí	Sí	No	No
Talla	1.53	1.50	1.30	0.95	1.27	0.97
Fracturas frecuentes	Sí	Sí	Sí	No	No	No
Densidad ósea aumentada	+	+	+	+	+	+
Frente abombada	+	+	+	+	+	+
Retraso del cierre de suturas	+	+	+	+	+	+
Hipoplasia mandibular	+	+	+	+	+	+
Proptosis ocular	+	+	+	+	+	+
Escleras azules	+	+	+	+	+	+
Nariz prominente	+	+	+	+	+	+
Retraso en la erupción dental	+	+	+	+	+	+
Mala oclusión dental	+	+	+	+	+	+
Hipoplasia del esmalte	+	+	+	+	+	+
Displasia clavicular	+	+	-	-	-	-
Braquidactilia de manos y pies	+	+	+	+	+	+
Acroosteolisis de falanges distales	+	+	+	+	+	+
Distrofia ungueal	+	+	+	+	+	+
Hipoacusia conductiva	-	-	-	-	+	-



Fotografía 8.-Imagen de frente de la paciente 4B. En ella puede apreciarse la frente prominente, nariz bulbosa y labios gruesos. El cabello es escaso y delgado. Puede observarse además la presencia de hombros caídos y la impresión clínica de hipoplasia clavicular.

Análisis radiológico

En cuanto a las características radiológicas en todos los casos se observó engrosamiento de las corticales óseas, aumento en la densidad mineral ósea (la cual se confirmó mediante estudio densitométrico), frontal prominente con falta de cierre de las suturas craneales, los huesos del cráneo son densos y en las imágenes laterales de cráneo se aprecia un ángulo mandibular obtuso con un prognatismo relativo además de un pobre desarrollo de los huesos faciales. La acrosteolisis de falanges distales (manos y pies) se observa en todos los casos, siendo ésta una de las características típicas de esta entidad. En las fotografías 8 y 9 se muestra una radiografía de cráneo del paciente 3A, en ella se aprecian las suturas abiertas y el aumento en la densidad de la cortical ósea, mientras que en las fotografías 9 y 10 se muestra una imagen de cráneo frontal paciente 2 en la que puede apreciarse la clásica imagen de antifaz ocasionada por el aumento de densidad de los huesos propios de la nariz. En cuanto a la fotografía 11 en la que se presenta una radiografía de ambas manos de la paciente 3A se aprecia la acrosteolisis de falanges distales de ambas manos, el cual es considerado un signo patognomónico de la entidad. Finalmente la fotografía 12 muestra una placa AP y Lateral de columna lumbosacra del paciente 1 en las cuales se puede observar la escoliosis lumbosacra.

Análisis de la densidad mineral ósea

En el caso de las pacientes 4A y 4B y su madre fue analizada la densidad mineral ósea mediante densitometría central de cadera y columna vertebral, empleando un equipo Hologic 2000, los valores fueron corregidos de acuerdo al área anatómica escaneada, los cuales se expresan de acuerdo a la densidad mineral del área (g/cm^2). En la madre, se encontró una reducción del 17% de la densidad mineral con relación al control sano de la misma edad y sexo. El análisis de la densidad del cuello femoral mostró también del 17%. Por otro lado, el análisis de la densidad ósea en la columna vertebral de la paciente 4A mostró 40% de incremento con relación al control sano de la misma edad y sexo, mientras que en el paciente 4B la densidad mineral mostró un incremento del 20% en columna y 40% en cadera.



Fotografía 9.- Radiografía de cráneo de la paciente 3A en la que se aprecian la sutura coronaria abierta y el aumento en la densidad de la cortical ósea.



Fotografía 10.- Radiografía frontal de cráneo de la paciente 2 en la que se aprecia la clásica imagen de antifaz, ocasionada por el aumento de densidad de los huesos propios de la nariz y parte de la sutura metópica la cual permanece abierta.



Fotografía 11.- Imagen de ambas manos de la paciente 3A en la cual es evidente la acroosteolisis de falanges distales en ambas manos.



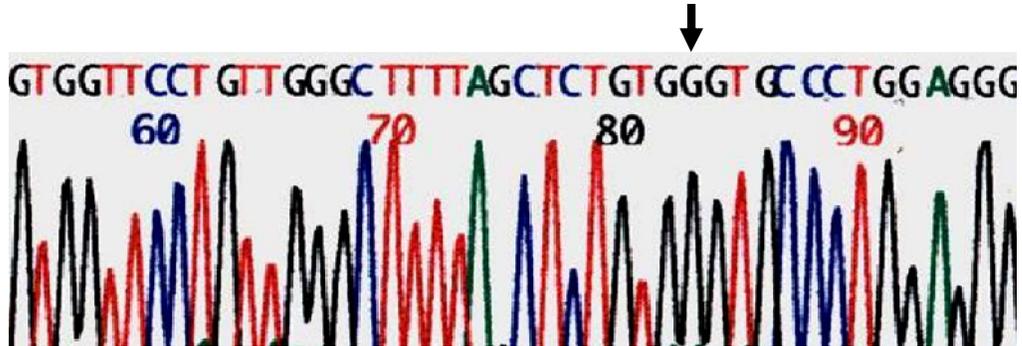
Fotografía 12.- Proyecciones AP y lateral de columna lumbosacra del paciente 1. En ellas se puede observar la escoliosis lumbosacra

Debemos destacar que los casos 1,2 y 3 corresponden a pacientes captados en unidades de traumatología cuyo ingreso se debió a la presencia de fracturas, en el 2 se refiere historia de varias fracturas previas, sobre todo en extremidades inferiores, mientras que en caso tres la paciente menciona la ocurrencia de más de 20 fracturas en distintos momentos de su vida, todas relacionadas con traumatismos leves. Por otro lado el caso familiar 4 fue detectado en un servicio de genética debido al estudio de la talla baja de la paciente.

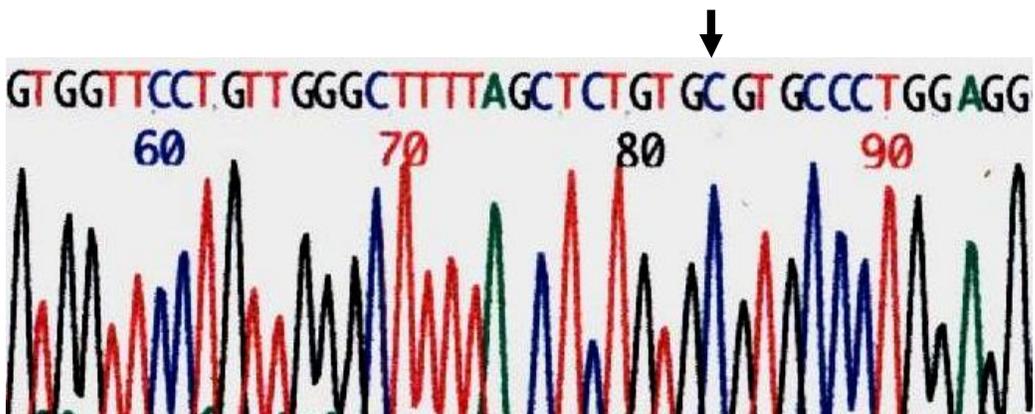
Finalmente, es importante mencionar que en la paciente 4A se realizó valoración auditiva la cual reveló hipoacusia conductiva bilateral.

Resultados del estudio molecular

El análisis de las secuencias de los exones 2-8 del gen CTSK en los casos analizados y en donde se incluyó un control sano. El estudio mostró que en los casos 4A y 4B ocurrió una mutación puntual con sentido (G/C) en el exón 5, lo que ocasiona el reemplazo de un residuo de Glycina por Arginina (GGT/CGT), (G146R) en la posición 146 de la proteína catepsina K, los dos casos de esta familia que fueron analizados mostraron dicha alteración. La figura 3 muestra el análisis del fragmento en el cual se detectó dicho cambio.



Paciente



Control

Discusión

La picnodisostosis es una osteocondrodisplasia poco frecuente que se hereda en forma autosómica recesiva. La caracteriza clínicamente la presencia de talla baja, deformidades craneales, fragilidad ósea e hipoplasia clavicular (7, 8). El defecto primario en esta enfermedad se relaciona con un gen localizado en los brazos largos del cromosoma 1 (1q22), el cual codifica para una proteína enzimática con actividad de cisteín-proteasa lisosomal conocida como catepsina K (CTSK) (27, 29, 31). Esta enzima rompe eficientemente los enlaces peptídicos de varias proteínas incluyendo algunas colágenas, elastina y gelatinina. La forma inmadura de esta proteína corresponde a un propéptido de 37 kDa, siendo la forma madura un monómero de 29 kDa. Este péptido contiene tres sitios potenciales de N-glicosilación, lo que aparentemente facilita su acceso a los lisosomas. Es importante señalar que a pesar de que esta enzima se expresa virtualmente en todas las líneas celulares, su deficiencia no refleja clínicamente el acumulo sistémico de substrato (s) en los tejidos, como ocurre en otras enfermedades por atesoramiento lisosomal, lo que sugiere que la picnodisostosis es un desorden causado por un defecto en la expresión tejido específica de la catepsina K (30, 31, 35). Este evento es poco común en las enfermedades por atesoramiento lisosomal.

En el presente trabajo se presentan tres pacientes mexicanos no relacionados con características clínicas compatibles con picnodisostosis. En los dos primeros reportes se trata de casos esporádicos y el otro corresponde a un caso de presentación familiar, en este último el antecedente de consanguinidad queda perfectamente documentado en el análisis familiar. Cabe señalar que a pesar de que en los dos primeros casos no se detectaron líneas de consanguinidad la posibilidad de este evento no se descarta totalmente debido a que el lugar de origen y residencia de los pacientes corresponde a poblaciones alejadas y aisladas. Estas características poblacionales

favorecen la presentación de enfermedades monogénicas autosómicas recesivas.

En cuanto al estudio molecular de este grupo de paciente, el análisis de la secuencia de los exones 2-8 del gen mostro información en sólo dos casos (los dos integrantes de la familia 4), en ellos se detectó una mutación puntual con sentido (G/C) en el exón 5, lo que ocasiona el reemplazo de un residuo de Glycina por Arginina (GGT/CGT), (G146R) en la posición 146 de la proteína. En este caso se trata de una nueva mutación sin sentido en el exón 5 del gen no informada previamente en la literatura y con ubicación en el péptido maduro. En la tabla 5 se concentran las mutaciones en el exón 5 del gen CTSK informadas por diferentes autores, se incluye además una clasificación de acuerdo al tipo de mutación, el cambio de aminoácidos que estas generan así como la parte del péptido en la cual repercuten.

Tabla 5.- Mutaciones en el exón 5 del gen CTSK reportadas en la literatura

Con sentido					
g.4120 C > T	c.422C > T	p.Ala141Val	Mature	Chavassieux, et al.,2008	
g.4134 G > C	c.436G > C	p.Gly146Arg	Mature	Gelb, et al., 1996	
g.4192 A > G	c.494A > G	p.Gln165Arg	Mature	Donnarumma, et al.,2007	
g.4258 A > C	c.560A > C	p.Gln187Pro	Mature	Li, et al., 2009	
g.4278 G > A	c.580G > A	p.Gly194Ser	Mature	Donnarumma, et al.,2007	
Sin sentido					
g.4266 C > T	c.568C > T	p.Gln190X	Mature	Hou, et al., 1999	
Dentro de la fase de lecturas (deleciones)					
g.4124 del T	c.426 del T	pPhe142LeufsX19	Mature	Fujita, et al., 2000	

Finalmente, es importante señalar que el análisis de los aspectos bioquímicos y moleculares de esta enfermedad, representa una buena alternativa para la búsqueda de nuevas opciones para el tratamiento de algunas enfermedades óseas, particularmente aquellas que se caracterizan por presentar una excesiva degradación de tejido óseo como ocurre en ciertos tipos de osteoartritis, enfermedades periodontales y la osteoporosis.

Conclusión

La picnodisostosis es una displasia ósea poco común, de la cual no ha sido posible identificar la frecuencia en nuestro país. Sin embargo, en las unidades de traumatología y ortopedia se observa con relativa frecuencia debido a la gran predisposición de fracturas que se presenta en los individuos que cursan con esta enfermedad. En este sentido, es importante mencionar que las características del tejido óseo de estos pacientes puede dificultar en algunas ocasiones el manejo quirúrgico de las fracturas que se presentan. En algunos casos se han informado asociaciones poco comunes como son la deficiencia de hormona de crecimiento, presencia de quistes porencefálicos, incluso alteraciones hematológicas. En nuestro grupo de pacientes encontramos que la paciente 4B presenta hipoacusia conductiva, lo que consideramos guarda relación con la fisiopatología de esta entidad, ya que clásicamente se presenta un aumento en la densidad mineral ósea, por lo que estimamos conveniente evaluar mediante las pruebas correspondientes la conducción auditiva de estos pacientes, es posible que muchos de ellos muestren grados variables de hipoacusia.

En este caso el estudio molecular reveló cambios en la secuencia del gen en sólo dos casos (de una misma familia), en ellos se detectó una transversión en exón 5 del gen relacionado con esta entidad (G/C), esto condicionó el reemplazo de un residuo de Glycina por Arginina (GGT/CGT), (G146R) en la posición 146 de la proteína. En este caso se trata de una nueva mutación sin sentido en el exón 5 del gen no informada previamente en la literatura y con ubicación en el péptido maduro.

Índice de tablas, figuras, fotografías y cuadros

Tablas

Tabla 1.- Espectro fenotípico de la picnodisostosis

Tabla 2.- Secuencia de los intrones y exones del gen CTSK

Tabla 3.- Mutaciones en el gen CPSK reportadas en la literatura (revisión reciente de Yang Xue y Colaboradores)

Tabla 4.- Características clínicas y radiológicas de los pacientes estudiados

Tabla 5.- Mutaciones en el exón 5 del gen CTSK reportadas en la literatura

Figuras

Figura 1.- Estructura y organización del gen CTSK

Figura 2.- Mutaciones en el gen CPSK reportadas en la literatura (revisión reciente de Yang Xue y Colaboradores) de acuerdo a su repercusión en el producto.

Figura 3. Estructura tridimensional de la catepsina K y su secuencia de aminoácidos.

Figura 4.- Árbol genealógico correspondiente a la familia

Figura 5.- Árbol genealógico correspondiente a la familia

Fotografías

Fotografías 1-7.- Imágenes del pintor Toulouse Lautrec en diferentes momentos de su vida,

Fotografía 8.- Imagen de cara de la paciente 4B

Fotografía 9.- Radiografía lateral de cráneo del paciente 3A

Fotografía 10.- Radiografía frontal de cráneo de la paciente 2

Fotografía 11.- Radiografía de manos de la paciente 3A

Fotografía 12.- Proyección AP y lateral de columna del paciente 1

Cuadros

Cuadros 1 y 2.- Pinturas de la época en donde aparece el pintor Toulouse Lautrec

Bibliografía

- 1.- Maroteaux, P. and M. Lamy. 1962. La pycnodysostose. Presse Med. 70:999-1002.
- 2.- Frey, J.B. 1995. What dwarfed Toulouse-Lautrec? Nature Genet. 10:128-130.
- 3.- Maroteaux, P. 1995. Toulouse -Lautrec's diagnosis (Letter). Nature Genet 11:363.
- 4.- Maroteaux, P. 1993. La maladie de Toulouse-Lautrec. Presse Med 23:1635-1640.
- 5.- Frey, J. 1994. Toulouse-Lautrec: A Life. New York: Viking Press (pub.).
- 6.- Elmore, S.M. 1967. Pycnodysostosis: a review. J Bone Joint Surg 49A:153-163.
- 7.- Mills, K.L.G. and A.W. Johnston. 1988. Pycnodysostosis. J Med Genet 25:550-553.
- 8.- Sedano, H.P., Gorlin, R. J., Anderson, V. E. 1968. Pycnodysostosis: clinical and genetic considerations. Am J Dis Child 116:70-77.
- 9.- Sugiura, Y., Yamada, Y. and J. Koh. 1974. Pycnodysostosis in Japan: report of six cases and a review of Japanese literature. Birth Defects Orig Art Ser X(12):78-98.
- 10.- Edelson, J.G., Obad, S., Geiger, R., On, A. and H.J. Artul. 1992. Pycnodysostosis: orthopedic aspects with a description of 14 new cases. Clin Orthop 280:263-276.
- 11.- Figueiredo, J., Reis, A., Vaz, R., Leao, M. and C. Cruz. 1989. Porencephalic cyst in pycnodysostosis. J Med Genet 26:782-784.
- 12.- Kajii, T., Homma, T. and Ohsawa, T. 1966. Pycnodysostosis. J Pediatr. 69:131-133.

13.- Kozlowski, K. and J.S. Yu. 1972. Pycnodysostosis: a variant form with visceral manifestations. *Arch Dis Child* 47:804-807.

14.- Lazner, F.; Gowen, M.; Pavasovic, D.; Kola, I. 1999. Osteopetrosis and steoporosis: two sides of the same coin. *Hum. Molec. Genet.* 8: 1839-1846, PubMed ID: [10469835](#)

15.- Meneses de Almeida, L. 1972. Contribution a l'etude genitique de la pycnodysostose. *Ann. Genet.* 15: 99-101. PubMed ID: [4537729](#)

17.- Norman, C.H.Jr. and J. Dubowy. 1971. Pycnodysostosis with splenomegaly and anemia. *NY State J. Med* 71:2419-2421.

18.- Seigman, E.L. and W.C. Kilby. 1950. Osteopetrosis: report of a case and review of recent literature. *Am J Roentgen* 63: 865-874.

19.- Soliman, A.T., Rajab, A., AlSalmi, I., Darwish, A. and M. Asfour. 1996. Defective growth hormone secretion in children with pycnodysostosis and improved linear growth after growth hormone treatment. *Arch Dis Child* 75:242-244.

20.- Taylor, M.M., Moore, T.M. and J.P.Jr. Harvey. 1978. Pycnodysostosis: a case report. *J Bone Joint Surg* 60A:1128-1130.

21.- Whyte MP. Trastornos del esqueleto genéticos, congénitos y displásicos. En: Favus MJ, editor. *Primer on the metabolism and disorders of mineral metabolism*. Barcelona: Medical Trends; 2005. p. 499-517.

22.- Wolpowitz A, Matisson A. A comparative study of pycnodysostosis, cleidocranial dysostosis, osteopetrosis and acro-osteolysis. *S Afr Med J.* 1974;48:1011-8. [\[Medline\]](#)

Everts V, Aronson DC, Beertsen W. 1999. Phagocytosis of bone collagen by osteoclasts in two cases of pycnodysostosis. *J Clin Invest.* 103:31-8.

23.- Roth, V.G. Pycnodysostosis presenting with bilateral subtrochanteric fractures: case report. *Clin Orthop Rel Res* 117:247-253, 1976.

24.- Rinnerthaler S, Roschger P, Jacob HF, Nader A, Klaushofer K, Fratzl P.1999. Scanning small angle x-ray scattering analysis of human bone sections. *Calcit Tissue Int.*;64:422-9.

25.- Meredith, S.C., Simon, M.A., Laros, G.S. and M.A. Jackson. 1978. Pycnodysostosis: a clinical, pathological, and ultramicroscopic study of a case. *J Bone Joint Surg* 60A:1122-1128.

26.- Seibel, MJ. 2006. Biochemical markers of bone turnover. Part II: Clinical applications in the management of osteoporosis. *Clin Biochem Rev* 27:123-38.

27.- Polymeropoulos, M.H., Ortiz De Luna, R.I., I de, S.E., Torres, R., Rubenstein, J. and C.A. Francomano. 1995. The gene for pycnodysostosis maps to human chromosome 1cen-q21. *Nature Genet* 10:238-239.

28.- Gelb, B.D., Edelson, J.G. and R.J. Desnick, 1995. Linkage of pycnodysostosis to chromosome 1q21 by homozygosity mapping. *Nature Genet* 10:235-237.

29.- Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A. and R.J. Desnick. 1996. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273:1236-1238.

30.- Inaoka, T.; Bilbe, G.; Ishibashi, O.; Tezuka, K.; Kumegawa, M.; Kokubo, T: 1995. Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 89-96, PubMed ID: [7818555](#)

- 31.- Rood, J.A., Van Horn, S., Drake, F.H., Gowen M. and C. Deboucj. 1997. Genomic organization and chromosome localization of human cathepsin K gene (CTSK). *Genomics* 41: 169-176.
- 32.- Elmore, S.M., Nance, W.E., McGee, B.J., Engel-De Montmollin, M. and E. Engel. 1966. Pycnodysostosis, with a familial chromosome anomaly. *Am Med* 40:273-282.
- 33.- Gelb, B.D., Willner, J.P., Dunn, T.M., Kardon, N.B., Verloes, A., Poncin, J. and R.J. Desnick. 1998. Paternal uniparental disomy for chromosome 1 revealed by molecular analysis of a patient with pycnodysostosis. *Am J Hum Genet* 62:848-854.
- 34.- Haagerup, A.; Hertz, J. M.;Christensen, M. F.;Binderup, H.; Kruse, T. A. 2000.Cathepsin K gene mutations and 1q21 haplotypes in patients with pycnodysostosis in an outbred population. *Europ. J. Hum. Genet.* 8: 431-436, PubMed ID: [10878663](#)
- 35.- Ho, N.;Punturieri, A.; Wilkin, D.; Szabo, J.; Johnson, M.; Whaley, J.; Davis, J.; Clark, A.; Weiss, S.; Francomano, C.1999. Mutations of CTSK result in pycnodysostosis via a reduction in cathepsin K protein. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1649-1653, PubMed ID: [10491211](#)
- 36.- Hou, W.-S.; Bromme, D.; Zhao, Y.; Mehler, E.; Dushey, C.; Weinstein, H.; Miranda, C. S.; Fraga, C.; Greig, F.; Carey, J.; Rimoin, D. L.; Desnick, R. J.; Gelb, B. D. 1999.:Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis. *J. Clin. Invest.* 103: 731-738, PubMed ID: [10074491](#)
- 37.- Johnson, M. R.; Polymeropoulos, M. H.; Vos, H. L.; Ortiz de Luna, R. I.; Francomano, C. A. 1996. A nonsense mutation in the cathepsin K gene observed in a family with pycnodysostosis. *Genome Res.* 6: 1050-1055, PubMed ID: [8938428](#)

38.- Yang Xue, Tao Cai, Songtao Shi, Weiguang Wang, Yanli Zhang, Tianqiu Mao and Xiaohong Duan. 2011, Clinical and animal research findings in pycnodysostosis and gene mutations of cathepsin K from 1996 to 2011. 6:20. <http://www.ojrd.com/content/6/1/20>.

39.- Gowen, M.; Lazner, F.; Dodds, R.; Kapadia, R.; Feild, J.; Tavaría, M.; Bertoncetto, I.; Drake, F.; Zavarselk, S.; Tellis, I.; Hertzog, P.; Debouck, C.; Kola, I. 1999. Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J. Bone Miner. Res.* 14:1654-1663, PubMed ID: [10491212](#)

40.- Littlewood-Evans, A. J.; Bilbe, G.; Bowler, W. B.; Farley, D.; Wlodarski, B.; Kokubo, T.; Inaoka, T.; Sloane, J.; Evans, D. B.; Gallagher, J. A. 1997. The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 47: 5386-5390.

41.- Motyckova, G., Weilbaecher, K.N., Horstmann, M.; Riemann, D.J., Fisher, D.Z. and D.E. Fisher. 2001. Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family. *Proc Nat Acad Sci* 98:5798-5803.

42.- Rantakokko, J., Aro, H.T., Savontaus, M. and E. Vuorio. 1996. Mouse cathepsin K: cDNA cloning and predominant expression of the gene in osteoclasts, and in some hypertrophying chondrocytes during mouse development. *FEBS Lett* 393:307-313.

43.- Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P. and K. von Figura. 1998. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci* 95:13453-13458.

44.- Shi, G.P., Chapman, H.A., Bhairi, S.M., DeLeeuw, C., Reddy, V.Y. and S.J. Weiss. 1995. Molecular cloning of human cathepsin O, a novel endoproteinase and homologue of rabbit OC2. FEBS Lett 357:129-134.