



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
ESPECIALIDAD EN:

GENÉTICA MÉDICA

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *COL1A1* EN PACIENTES CON
DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE OSTEOGÉNESIS IMPERFECTA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN

GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A:

DRA. JUDIT ANGELICA RAMIREZ ROSETE



PROFESOR TITULAR: Dra. en C. MARGARITA VALDÉS FLORES
ASESOR: DR. en C. ALBERTO HIDALGO BRAVO
ASESOR: DR. en C. ANTONIO MIRANDA DUARTE
CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2016



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 HERNANDEZ LÓPEZ
SUBDIRECTORA DE POSTGRADO
Y EDUCACIÓN CONTINUA

DR. ALBERTO UGALDE REYES RETANA
JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA

DRA. en C. MARGARITA VALDÉS FLORES
PROFESOR TITULAR

DR. en C. ANTONIO MIRANDA DUARTE
ASESOR CLÍNICO

DR. en C. ALBERTO HIDALGO BRAVO
ASESOR METODOLÓGICO

Índice

• Resumen	6
• Epidemiología	8
• Antecedentes históricos	8
• Clasificación de la Osteogénesis Imperfecta	10
• Cuadro clínico	
○ Presentación clínica y características clínicas de Osteogenesis Imperfecta comunes a diferentes tipos de Osteogenesis Imperfecta.....	17
○ Datos clínicos y radiográficos específicos de cada tipo de Osteogenesis Imperfecta	19
• Biosíntesis de la colágena tipo 1	22
• Defectos en genes que alteran la estructura de la colágena	25
• Defectos en genes que afectan el procesamiento de la colágena	25
• Defectos en genes que afectan las modificaciones post traduccionales de la colágena y su plegamiento	27
• Genes implicados en el plegamiento y entrecruzamiento de la colágena..	27
• Genes relacionados con la osificación y mineralización ósea	28
• Defectos en el desarrollo de los osteoblastos	29
• Osteogenesis Imperfecta de herencia autosómica recesiva	29
• Bases moleculares	33
• Diagnóstico	39
• Tratamiento	41
• Diagnóstico diferencial	45
• Objetivos	
○ General	49
○ Específico	49
• Planteamiento del problema y justificación	49

- Hipótesis50
- Diseño del estudio50
- Tamaño de la muestra50
- Análisis y métodos estadísticos de los datos50
- Población de estudio50
- Metodología51
- Análisis bioinformático59
- Resultados
 - Análisis clínico 60
 - Análisis radiográfico 69
 - Análisis de resultados de estudio molecular 73
- Discusión 81
- Bibliografía87

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN COL1A1 EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE OSTEOGÉNESIS IMPERFECTA.

Ramírez Rosete Judit Angélica. Médico Residente de tercer año de la especialidad en Genética Médica del Instituto Nacional de Rehabilitación

Hidalgo Bravo Alberto. Médico Investigador en Ciencias Médicas del servicio de Genética Médica del Instituto Nacional de Rehabilitación

Antonio Miranda Duarte. Médico Investigador en Ciencias Médicas del servicio de Genética Médica del Instituto Nacional de Rehabilitación

Resumen

La Osteogénesis Imperfecta (OI) es el término colectivo que se utiliza para un grupo heterogéneo de enfermedades del tejido conectivo caracterizadas principalmente por la susceptibilidad a fracturas óseas con severidad variable, a lo largo de la vida, con un patrón de herencia autosómico dominante en un 90-95% y penetrancia del 100%. Esta fragilidad del tejido óseo está debida, en la mayor parte de los casos, a defectos en la biosíntesis de la colágena tipo 1. También se han observado formas recesivas, causadas por mutaciones en otros genes. Se han identificado cuatro tipos clínicamente diferentes, la característica más importante en todos ellos es la fragilidad ósea que se manifiesta con múltiples fracturas sin traumas previos. En el 90-95% de los casos, la OI está provocada por mutaciones en los genes *COL1A1* (17q21.33) y *COL1A2* (7q21.3), los cuales codifican para las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la colágena.

El tipo I se caracteriza principalmente por no ser deformante, escleras azules y no presentar dentinogénesis imperfecta. En el tipo II es frecuente la presencia de múltiples fracturas principalmente de costillas y huesos largos al nacimiento, escleras oscuras y mal pronóstico ya que la mayoría fallece. El tipo III incluye, talla

baja, escleras azul-grisáceas o blancas, presencia de dentinogénesis imperfecta y deformidad ósea severa progresiva. El tipo IV, presenta talla ligeramente por debajo del percentil para su edad, escoliosis leve a moderada, escleras grises o blancas y deformidad ósea no progresiva.

Dentro de las características radiológicas observadas se encuentra la presencia de osteoporosis, disminución de densidad ósea, presencia de huesos wormianos, fracturas por compresión, escoliosis de grado variable, entre otras.

En éste trabajo se realizó un análisis clínico, radiológico y molecular de pacientes con diagnóstico de Osteogénesis imperfecta. Se realizó secuenciación de los exones 8, 11, 15, 33/34, 37 y 44 del gen *COL1A1* debido a que son los que se han reportado con el mayor número de mutaciones. Se encontraron 21 variantes en la secuencia del gen *COL1A1*. Dichas variantes no han sido reportadas previamente. El análisis bioinformático sugiere que las variantes encontradas pueden ser dañinas y por tanto requieren un mayor estudio para correlacionarlas con la enfermedad.

Epidemiología

La OI es una enfermedad poco frecuente, se presenta en 1:15,000 a 20,000 recién nacidos vivos (Van Dijk & Sillence, 2014). La prevalencia e incidencia de los diferentes tipos de OI varía entre ellos. Los tipos I y IV representan más de la mitad de todos los casos. En Victoria, Australia, se reportó una prevalencia de 3-4/100,000 y una incidencia de 3.5/100,000 para OI tipo I. Para el tipo II reportaron una incidencia de 1-2/100,000, sin embargo, los datos de su prevalencia no están disponibles porque tiene letalidad prenatal (Sillence, Senn, & Danks, 1979). La OI tipo III tiene una prevalencia estimada de 1-2/100,000 e incidencia de 1.6/100,000 en población de Australia. (Van Dijk et al., 2011)

Antecedentes Históricos

A través de la historia la Osteogénesis imperfecta ha recibido un gran número de epónimos como síndrome de Vrolik's, síndrome de escleras azules, distrofia o displasia periostal, huesos frágiles, triada de Van der Hoeve, entre otros. Esto ha complicado su estudio ya que dificulta la identificación precisa de los individuos afectados.

En 1969 Gray y colaboradores, describieron un niño Egipcio que data la dinastía 21ª con OI (cerca del año 1000 A.C), este representa el caso conocido más viejo del síndrome. El primer caso reportado en la literatura fue a hecho por Melabranche (1674), él reportó un varón de 20 años de edad con retraso mental y fracturas de múltiples huesos que lo "condenó al uso de silla de ruedas". Este reporte de caso inició la creencia de que la OI era causada por madres embarazadas que presenciaron la ejecución de un criminal en la rueda. Fue el cirujano Sueco, Olaus Jakob Ekman, quien dio la primera descripción científica de la OI en 1788. A pesar de que sus pacientes se consideraron como casos de osteomalacia, estos representan en realidad casos de OI (Ekman 1788). Edmond Axman describió por primera vez las cuatro características principales de la OI: fragilidad ósea, hiperlaxitud articular con fácil dislocación, escleras azules y un cuerpo frágil (Axman 1831). El cirujano franco-alemán Johann Friedrich Georg Christian Martin Lobstein

reconoció la naturaleza hereditaria de la OI. En la literatura francesa esta condición fue conocida como “La maladie de Lobstein” (Lobstein 1833). Fue hasta 1984 que Willem Vrolik introdujo el término de osteogénesis imperfecta para referirse a esta enfermedad. (Baljet, 2002)

Willem Vrolik en su libro, “*Handbook of Pathological Anatomy and Tabulae*” (en su versión en latín), utiliza en el encabezado de la placa 91 el término osteogénesis imperfecta, describiendo el caso de un recién nacido, quien falleció tres días posteriores a su nacimiento con numerosas fracturas. El cuerpo del niño fue disecado y encontró que su esqueleto tenía un pobre desarrollo, mineralización ósea disminuida, presentaba fractura de cráneo; el hueso frontal, parietales y occipital consistían de muchos núcleos óseos irregulares y abundantes huesos wormianos, asimismo, mostraba datos de hidrocefalia, frente y fontanelas amplias, cara pequeña y estrecha, orbitas poco profundas con occipucio prominente. Además, cada hueso del esqueleto mostraba múltiples fracturas, algunas regenerándose con formación de callo óseo. Los huesos tubulares, aunque de adecuado tamaño, estaban ligeramente curvos, delgados, con múltiples fracturas y también mostraban formación de callo óseo. Con estos datos se hizo el diagnóstico de OI tipo II en 1998 (Baljet, 2002).

Willem Vrolik fue uno de los primeros en darse cuenta que muchas de las displasias esqueléticas no eran resultado de una enfermedad adquirida después del nacimiento, tales como el “raquitismo” o la “osteomalacia” como muchos de sus contemporáneos creían. Él consideró que debía existir una “energía generativa” intrínseca e insuficiente, lo cual justificó en este caso como un defecto primario en la osificación y no una degeneración secundaria, sin embargo, la condición de éste paciente fue nombrada por Justus Lodewijk como “raquitismo congénito” en el “*Catalogue de la Collection d’Anatomie Humaine, Comparée et Pathologique*”. (Baljet, 2002)

Otro caso de los archivos de Vrolik fue el de un infante con OI que mostró talla baja proporcionada, cráneo ancho sin huesos wormianos, fracturas en casi todas las

costillas y huesos tubulares, a excepción de la tibia y peroné, con deformidades posturales severas, diáfisis anchas en todos los huesos. Sin embargo, la consolidación de las fracturas era adecuada. Con lo anterior, se propuso el diagnóstico de OI tipo III en 1998 (Baljet, 2002).

En 1974, se describió por primera vez alteración en la agregación de la colágena en tres pacientes con OI por microscopia electrónica de hueso. En 1977 Sykes y cols, informaron una relación alterada en la colágena tipo uno y tres en las digestiones con pepsina de la piel en pacientes con OI utilizando un método de electroforesis en gel de poliacrilamida. (Sykes, Bryan Ph D. Martin J.O Francis, D.Phil. Roger Smith, 1977). En 1983, se descubrió la presencia de una delección interna de cerca de 0.5 kb en un alelo del gen *COL1A1* que codifica para la cadena pro- α 1 de la colágena tipo 1 en un paciente con OI (Chu et al., 1983).

Clasificación.

En 1979 se realizó un estudio epidemiológico y genético de Osteogénesis imperfecta en Victoria, Australia, en el cuál se incluyeron 180 pacientes con OI. De acuerdo a sus características clínicas y el patrón de herencia se clasificaron en 4 síndromes de forma primaria.

- Grupo 1. OI con herencia dominante y escleras azules: la cual se caracteriza por fragilidad ósea, escleras azules, hipoacusia presenil o historia familiar de hipoacusia presenil, deformidades en extremidades inferiores que usualmente consistían en encorvamiento anterior o lateral del fémur o anterior de la tibia, cifosis, escoliosis o cifoescoliosis y facie triangular (Sillence et al., 1979).
- Grupo 2. OI letal perinatal con fémures de apariencia arrugada en la radiografía y costillas en forma de cuentas. Estos pacientes presentaban bajo peso al nacimiento, longitud cráneo-caudal disminuida y escleras azules. Dentro de las características radiológicas, el fémur con apariencia arrugada, angulación de la tibia y algunas veces del fémur. Además, fracturas y deformidades en los ejes de los huesos de las extremidades superiores,

platispondilia y costillas en forma de rosario, con pobre osificación de forma uniforme (Sillence et al., 1979).

- Grupo 3. OI progresivamente deformante con escleras normales. Todos los pacientes catalogados en este grupo tenían escleras blancas o gris-azules muy claro, sus huesos estaban torcidos, incurvados y frágiles. La deformidad progresó con la edad y los adultos mostraban deformidades severas en columna vertebral. La mayoría de estos individuos nacieron a término con peso y talla adecuados para edad gestacional. A la exploración las fontanelas anterior y posterior eran amplias, suturas craneales separadas y presencia de múltiples huesos wormianos, facie triangular, hiperlaxitud articular con predominio de las articulaciones metacarpo-falángicas e interfalángicas. Los dientes mostraron dentinogénesis imperfecta acompañado de hipoacusia (Sillence et al., 1979).
- Grupo 4. OI de herencia dominante con escleras normales. Se observó en 8 individuos con osteoporosis con o sin historia de fracturas, con grado variable de deformidades esqueléticas pero sin escleras azules, ni alteraciones en la audición (Sillence et al., 1979).

Con base en estos hallazgos, Sillence y cols sugirieron que al menos había 4 síndromes conocidos como OI (Sillence et al., 1979). La numeración de los tipos I-IV se insertó posterior a una reunión con el Dr. Víctor McKusick quien fue capaz de poner estos síndromes en la base de datos, Mendelian Inheritance in Man (MIM). Los tipos iniciales reflejan el orden de aparición en el manuscrito de Sillence y cols (ver tabla 1). Cada uno de los cuatro grupos muestra diferente modo de herencia, siendo el tipo autosómico dominante la forma predominante para el grupo I y IV y al menos algunas familias mostraron herencia autosómica recesiva en los grupos II y III, por lo que estas observaciones sugerían heterogeneidad genética (Van Dijk & Sillence, 2014).

Tabla 1. Clasificación clínica de OI, modificado de Silience et al., 1979.

Nomenclatura de los síndromes de OI			
Tipo numérico sugerido	Sufijos de clasificación	Modo de herencia	Sinónimos reportados y epónimos.
I	Congénita tarda	Autosómica dominante	Herencia dominante en su mayoría, con escleras azules distintivas, síndrome de Van der Hoeve's, triada del óseo frágil, OI tarda leve, OI tarda tipo II (deformidad ósea leve), síndrome de Eddowe's
II	Congénita (siempre)	Autosómica recesiva	OI perinatal letal, OI Vrolik letal, OI congénita letal
III	Congénita (tarda)	Autosómica recesiva	OI progresivamente deformante con escleras normales, OI congénita, OI tarda gravis, OI (deformidad en huesos largos severa), OI congénita tipo Vrolik, displasia periosteal de Porak y Durante, osteopsitrosis idiopática de Lobstein.
IV	Congénita tarda	Autosómica dominante	OI con herencia dominante y escleras normales, osteopsitrosis idiopática de Lobstein, enfermedad de Ekman-Lobstein

La OI tipo II fue subsecuentemente subdividida en tipo II A, B y C basada en sus características radiológicas. En 1983 fue descrita la primera causa genética de esta

enfermedad al encontrarse una delección interna en el gen codificante para la cadena alfa uno de la colágena tipo 1 (*COL1A1*) en una paciente con OI tipo II. En los años subsecuentes se descubrieron otras mutaciones en el gen *COL1A1* y también se encontraron mutaciones en el gen *COL1A2* que codifica para la cadena alfa dos de la colágena tipo 1 en todos los tipos de OI (Van Dijk & Silience, 2014).

En el 2004 una clasificación ampliada de Silience fue publicada por Glorieux y Rauch añadiendo los tipos V a VII de OI, con defectos genéticos desconocidos y herencia presuntamente autosómica dominante en la OI tipo V y autosómica recesiva para los tipos VI y VII. En 2006 se describió la primera causa de OI tipo VII con herencia autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *CRTAP* (Van Dijk & Silience, 2014). En la actualidad se han descrito un total de 17 genes relacionados a esta patología. Sin embargo, las mutaciones en *COL1A1* y *COL1A2* siguen representando la gran mayoría de pacientes con OI, aproximando un 90% de todos los casos (Forlino & Marini, 2015).

Revisiones en la nomenclatura reflejaron que, con el descubrimiento de mutaciones en nuevos genes, se ha incrementado el número de tipos hasta el XIV. Esto es confuso en la práctica clínica, ya que los nuevos tipos no son mutuamente excluyentes. En tanto que los tipos I-IV se definen por las características específicas clínicas y radiológicas, de acuerdo a la nueva clasificación de OI, los nuevos tipos añadidos se definen por el gen afectado (ver tabla 2), sin embargo, las características clínicas continúan siendo consideradas dentro de los tipos I-IV (Van Dijk & Silience, 2014).

Cerca del 85-90% de los casos son causados por mutaciones en genes que afectan la cantidad o estructura de la colágena. Actualmente la OI se define como un desorden relacionado a la colágena. La identificación del primer gen recesivo causante de OI inició la búsqueda de nueva información en el área de la genética en esta enfermedad. Siete formas recesivas son causadas por defectos en genes cuyo producto proteico interactúa con el plegamiento del colágena o sus modificaciones post-traduccionales. Otras dos formas raras afectan principalmente la mineralización ósea, pero también disminuyen la producción de colágena. El gen

más recientemente identificado *SP7*, se relaciona con defectos en la diferenciación de los osteoblastos (Caparro et al., 2010).

En la reunión del 2009 del Grupo Internacional de Nomenclatura para los Trastornos Constitucionales del Esqueleto (INCDS), se tomó la decisión de agrupar a los síndromes de OI en 5 tipos. De esta manera, se preservaron los 4 grupos primarios y se adicionó el tipo V. La importancia de las diferentes causas genéticas y los tipos de OI se reconoció mediante la encapsulación de los genes causantes como subtipos de OI I-V (Van Dijk & Sillence, 2014). En el 2015 se realizó la revisión más reciente de la nosología en Bolonia, Italia, en la cual se estableció una disminución en el número de enfermedades, mientras que el número de genes aumentó considerablemente. Tal es el caso de la OI, que continúa su expansión por el descubrimiento de nuevos genes; en ésta se optó por continuar con la clasificación de Sillence, que se basa en la parte fenotípica y no en la molecular. Por lo anterior, es que el tipo V se incluye en la clasificación, es decir, por sus características radiológicas distintivas (Bonafe et al., 2015).

Tabla 2. Nomenclatura de los genes causales y su correlación con el fenotipo asociado según la clasificación de Sillence

Tipo	Nombre	Gen	Locus	Herencia
1 (A)	OI no deformante con escleras azules	<i>COL1A1</i>	17q21.33	AD
		<i>COL1A2</i>	7q22.3	AD
2* (B)	OI forma letal perinatal	<i>COL1A1</i>	17q21.33	AD
		<i>COL1A2</i>	7q22.3	AD
		<i>CRTAP</i>	3p22.3	AR
		<i>LEPRE1</i>	1p34.2	AR
		<i>PPIB</i>	15q22.31	AR
3 (B)	OI progresivamente deformante	<i>COL1A1</i>	17q21.3	AD
		<i>COL1A2</i>	7q22.3	AD
		<i>BPM1</i>	8p21.3	AR

		<i>CRTAP</i>	3p22.3	AR
		<i>FKBP10</i>	17q21.2	AR
		<i>LEPRE1</i>	1p34.2	AR
		<i>PLOD2</i>	3q24	AR
		<i>PPIB</i>	15q22.31	AR
		<i>SERPINF1</i>	17p13.3	AR
		<i>SERPINH1</i>	11q13.5	AR
		<i>TMEM38B</i>	9q31.1	AR
		<i>CREB3L1</i>	11q11	AR
		<i>WNT1</i>	12q13.12	AR
		<i>SP7</i>	13q13.13	AR
		<i>SEC24D</i>	4q26	AR
4 (A)	OI moderadamente deformante con escleras normales	<i>COL1A1</i>	17q21.33	AD
		<i>COL1A2</i>	7q22.3	AD
		<i>WNT1</i>	12q13.12	AD
		<i>CRTAP</i>	3p22.3	AR
		<i>PPIB</i>	15q22.31	AR
		<i>SP7</i>	13q13.13	AR
		<i>PLS3</i>	Xq23	LX
		<i>KFBP10</i>	17q21.2	AR
5 (A)	OI con calcificaciones en las membranas interóseas	<i>IFITM5</i>	11p15.5	AD

A: fenotipo con severidad leve a moderado. B: Fenotipo perinatal letal y progresivamente deformante.

* En la práctica clínica la subdivisión del tipo II A y B sigue en uso, OI tipo II A parece ser exclusivamente causado por mutaciones heterocigotas en los genes *COL1A1/COL1A2*.

AD; autosómica dominante, AR; autosómica recesiva, LX; ligada al X.

La clasificación clínica y genética ha surgido para abarcar las formas raras de OI, ya que la mayoría de los nuevos genes no tienen características diagnósticas

específicas. En una clasificación genética, los tipos de Sillence solo se utilizan para mutaciones en la colágena y el numerador es continuo por cada nuevo gen descubierto. Este patrón elimina la posibilidad de que un mismo individuo tenga una herencia dominante y recesiva, o bien, que sea reclasificado a un tipo distinto de OI, como resultado de la gravedad durante su vida y/o la variabilidad intrafamiliar observada en hermanos afectados. Por lo tanto, proporciona una mejor disposición para la investigación y tratamiento clínico con respecto a la clasificación clínica. Sin embargo, la clasificación genética tiene la desventaja de una lista en constante crecimiento, que puede ser difícil de manejar para los médicos genetistas y padres de los afectados.

Para satisfacer los requerimientos clínicos y genéticos, se ha propuesto una clasificación funcional metabólica que puede tener una utilidad más amplia y permitir la retención de la numeración con base en el defecto genético. En este plan, los genes cuyos productos funcionan en la misma vía, y que probablemente tienen mecanismos compartidos, están dispuestos en 5 grupos funcionales. Por otra parte, la identificación en los defectos de la colágena, demostró que la forma descrita por Sillence como tipo I, se relaciona con una deficiencia en la cantidad de la colágena estructuralmente normal, mientras que las formas letal (tipo II), severa (tipo III) y moderada (tipo IV), se relacionan con mutaciones que alteran la estructura de la colágena (Forlino & Marini, 2015).

- **Grupo A:** Defectos primarios en la estructura o procesamiento de la colágena (*COL1A1, COL1A2, BMP1*)
- **Grupo B:** Defectos en la modificación de la colágena (*CRTAP, LEPRE1, PPIB, TMEM38B*)
- **Grupo C:** Defectos en el plegamiento y entrecruzamiento de la colágena (*SERPINH1, FKBP10, PLOD2*)
- **Grupo D:** Defectos en la mineralización y osificación (*IFITM5, SERPINF1*)
- **Grupo E:** Defectos en el desarrollo de los osteoblastos con insuficiente colágena (*WNT1, CREB3L1, SP7*)

Cuadro clínico

Presentación clínica y características clínicas de OI comunes a diferentes tipos de OI.

La OI es un desorden generalizado del tejido conectivo, cuyas características se extienden más allá de lo esquelético, como son el hallazgo de escleras azules, hipoacusia, disminución de la función pulmonar y regurgitación valvular cardíaca. Notablemente las características secundarias se encuentran ausentes en las formas recesivas reconocidas hasta el momento (Forlino & Marini, 2015).

La predisposición a las fracturas y osteoporosis, es considerada la característica más importante en las familias con OI tipo I. Se ha observado que aproximadamente el 10% de los individuos afectados no presentó ninguna fractura durante su niñez y que la osteoporosis se desarrolla en la mayoría de los pacientes con OI. Los hallazgos séricos y urinarios de elevación de marcadores de recambio óseo, junto con los resultados de la histomorfometría ósea, se explican mejor por una combinación de aumento de la formación y resorción ósea, teniendo como consecuencia, una tasa de resorción ósea mayor que la de formación. La inmovilización secundaria a las fracturas lleva a un efecto negativo en la formación de hueso, al ser factor en la resorción ósea.

Las escleras azules (ver figura 1) son un signo constante en pacientes que se presenta desde el nacimiento y no desaparece. Anteriormente se creía que la coloración gris azul en el tipo I, se debía a un adelgazamiento de la esclera (Evereklioglu, Madenci, Bayazit, & Bekir, 2002). Sin embargo, se conocen estudios con reporte de un espesor global normal de la esclera, sin aumento de material granular entre las fibras de colágena, lo cual contradice la teoría anterior (Sarathchandra, Pope, & Ali, 1999). Por lo anterior, la etiología de la coloración de las escleras en la OI tipo I aún es incierta (Zack, Zack, Surtees, & Neville, 2007).



Figura. 1 Madre e hija con diagnóstico de OI tipo I, donde se observa la presencia de escleras azules, característica frecuente en esta entidad. Tomado de Van Dijk et al., 2011.

Otra característica que se puede encontrar en pacientes con OI, es la dentinogénesis imperfecta (DI), la cual produce una apariencia en los dientes de coloración amarillenta distintiva y apariencia translúcida (ver figura 2). Algunos dientes pueden tener una tonalidad particular grisácea y fractura de la tapa de esmalte con desgaste secundario. (Van Dijk & Silience, 2014). La prevalencia de la DI en la dentición primaria varía del 28 a 80%, es más alta en los tipos III y IV de OI, mientras que es menos frecuente en el tipo I. En el tipo II las alteraciones dentales pueden o no estar presentes, empero cuando un padre es mosaico, hay una alta concordancia con la presencia de DI entre los padres afectados y su descendencia. El fenotipo puede variar entre la dentición primaria y la permanente. La decoloración de los dientes y el desgaste es menos grave en la dentición permanente a comparación de la primaria. En las radiografías de los dientes se observó aumento de la constricción en la unión corono-radicular, obliteración progresiva de la pulpa por dentina secundaria y raíces más cortas y débiles. Otras alteraciones dentales incluyen bandas transversas de decoloración de las coronas, translucidez de la corona, erupción ectópica o impacto de los molares permanentes y agenesia dental. En todos los tipos de OI, se puede observar mal oclusión dental clase II, mordida cruzada anterior o posterior y mordida abierta (Bailleul-Forestier et al., 2008).



Figura 2. Características de la dentinogénesis imperfecta, se observa la coloración amarillenta y apariencia translúcida, en un paciente con OI tipo III. Tomado de (Rohrbach & Giunta, 2012)

Además de lo ya mencionado, los pacientes pueden presentar deformaciones secundarias, tales como escoliosis e impresión basilar. Aunque la ausencia de deformidad de huesos largos se ha propuesto como criterio diagnóstico para esta enfermedad, éste parece ser influenciado, al menos parcialmente, por la calidad de la atención de las diversas fracturas, más que por un proceso intrínseco de deformación de hueso (Van Dijk & Sillence, 2014).

Datos clínicos y radiográficos específicos de cada tipo de OI:

- a) **OI tipo I** (no deformante con escleras azules): Se caracteriza por aumento de la fragilidad ósea, el cual está asociado con disminución en la masa ósea., Además los individuos afectados presentan escleras con una coloración azul-grisácea distintiva, susceptibilidad a hipoacusia conductiva que comienza en la adolescencia y adultez temprana. La deformidad de los huesos largos y columna vertebral es poco habitual. Es el tipo más frecuente con una prevalencia de 1:25,000 recién nacidos vivos (RNV). La frecuencia de fracturas y deformidad de huesos largos y columna vertebral por lo general es baja, no obstante, puede ser mayor cuando está presente la DI. Los pacientes con OI tipo I y DI presentan mayor frecuencia en el número de fracturas, talla baja más severa y mayor deformidad esquelética. En ambos grupos se observa una frecuencia similar de hiperlaxitud articular, sangrados y presencia de hematomas sin causa aparente, hipoacusia y dislocación articular. El déficit auditivo resulta de hipoacusia conductiva y sensorial en más del

50% de los pacientes con OI a los 40 años, además, se ha observado la presencia de vértigo. La penetrancia de las escleras azules es cerca del 100% pero la frecuencia de las fracturas clínicas es del 90-95% (Van Dijk & Silience, 2014).

- b) **OI tipo II** (letal perinatal): Las características esqueléticas, articulares y extra esqueléticas de este grupo, son extremadamente severas. La letalidad perinatal es un resultado más que una característica diagnóstica. Los fetos son detectados a las 18-20 semanas de gestación (sdg) con acortamiento de huesos largos, así como deformidades de angulación. También presentan una marcada deficiencia en la osificación de los huesos de forma generalizada. A esta edad gestacional, puede haber algunas fracturas de costillas, con cada mes de gestación que pasa las fracturas de costillas son más frecuentes, dando una apariencia de costillas en forma de rosario, combinado con huesos largos de apariencia arrugada (forma de acordeón). Se han reportado casos limitados con alteraciones neuropatológicas como defectos en la migración neuronal o sustancia blanca. El tórax es pequeño para la edad gestacional, la función respiratoria puede estar disminuida debido al dolor secundario a las múltiples fracturas costales, las características clínicas sugieren que los recién nacidos se encuentran en constante dolor. Aproximadamente un 20% de todos los pacientes con éste diagnóstico, son mortinatos; respecto de los sobrevivientes, el 90% fallecen en las primeras cuatro semanas de vida extrauterina (Van Dijk & Silience, 2014).
- c) **OI tipo III** (progresivamente deformante): Usualmente se identifica en recién nacidos o en menores con fragilidad ósea con historia de múltiples fracturas que llevan a una deformidad del esqueleto. Generalmente los pacientes nacen cercanos al término con adecuado peso y talla para la edad gestacional, aunque esto puede estar disminuido por las deformidades de extremidades inferiores al nacimiento. Si bien pueden tener escleras azules al nacimiento, se ha observado que en muchos pacientes la coloración azul disminuye con la edad. La persistencia de las

escleras azules usualmente indica mutaciones sin sentido o de cambio en el marco de lectura en el gen de la *COL1A1*. Por otro lado, se ha observado que los pacientes con OI con herencia autosómica recesiva, usualmente tienen escleras grisáceas-blancas (Byers & Pyott, 2012). Todos los pacientes tienen pobre crecimiento longitudinal, con talla para la edad y sexo generalmente por debajo del percentil tres. La cifoescoliosis progresiva se desarrolla durante la infancia y progresa durante la adolescencia, la hipoacusia es más frecuente en los adultos, la dentinogénesis imperfecta es una característica variable. Al nacimiento, en los estudios radiográficos se observa osteopenia generalizada y múltiples fracturas, deformidades con angulación en varios grados, que dan la apariencia de “huesos anchos”. Las metáfisis desarrollan aumento de la densidad y bordes irregulares que dan la apariencia de “palomitas de maíz”, las costillas son delgadas y osteopénicas, el cráneo muestra múltiples huesos wormianos que se vuelven más evidentes al transcurrir varias semanas o meses de edad (Van Dijk et al., 2011). Anteriormente, dos tercios de los pacientes fallecían al final de la segunda década de la vida, generalmente debido a complicaciones derivadas de la deformidad en tórax incluyendo la cifoescoliosis, hipertensión pulmonar y falla cardiorrespiratoria. Actualmente la mayoría de los pacientes sobreviven hasta la edad adulta.

- d) **OI tipo IV** (moderadamente deformante con escleras normales): Estos pacientes presentan fracturas recurrentes, osteoporosis y diversos grados de deformidad de huesos largos y columna vertebral, pero presentan escleras de coloración normal, En algunas ocasiones las escleras pueden estar azuladas al nacer, pero la coloración se desvanece en la infancia. La hipoacusia no es frecuente en este grupo de pacientes. El síndrome de compresión de la fosa posterior, debido a impresión basilar con elevación del piso de la fosa craneal posterior, tiene una prevalencia aumentada en estos pacientes. Los individuos que además presentan dentinogénesis imperfecta, tienen un riesgo relativo

incrementado en cinco veces de padecerla. Un estudio reportó que un 30% padecen el síndrome de compresión de la fosa posterior, siendo solo un 16% sintomáticos (Sillence, 1994).

- e) **OI tipo V:** Se caracteriza por presentar talla baja, escleras blancas y calcificación de membranas interóseas. La calcificación de membranas interóseas tiene como característica la formación de callo hipertrófico por lo general en el sitio de la fractura y con frecuencia en el eje femoral, la calcificación de la membrana interósea entre cúbito y radio lleva a imposibilidad del movimiento de pronosupinación. Éste tipo representa el 5% de todas las OI.

Biosíntesis de la colágena tipo 1

La colágena tipo 1 es un heterotrímero, el cual contiene dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$.

Aproximadamente el 90% de los individuos afectados con OI son heterocigotos para una variante en uno de los dos genes de la colágena tipo 1. *COL1A1* y *COL1A2*, codifican para las cadenas pro- $\alpha 1$ y pro- $\alpha 2$ de la procolágena tipo 1 respectivamente. Las cadenas de procolágena se sintetizan en el núcleo celular y se transportan al citoplasma donde la procolágena tipo 1 se transloca cotraduccionalmente en el lumen del retículo endoplásmico rugoso. Posteriormente, se forma una molécula de procolágena con propéptidos globulares en sus extremos N-terminal y C-terminal flanqueando el dominio helicoidal, el cual contiene tripletes ininterrumpidos de Gly-Xaa-Yaa. La combinación de glicinas en cada tercer aminoácido permite que se ensamble la triple hélice y se estabilice mediante puentes de hidrógeno y otras cargas negativas (Dalglish, 1997). En este sitio, la interacción entre los C-propéptidos está altamente estabilizada por las uniones disulfuro intercadena. Las dos cadenas pro- $\alpha 1$ y una pro- $\alpha 2$ se arman en dirección carboxilo a amino terminal para formar la triple hélice. Las cadenas de procolágena se reúnen en su C-propéptido y se pliegan hacia el N-terminal. Las cadenas que no se pliegan son sometidas a múltiples modificaciones postraduccionales. Los

residuos de prolina y lisina a lo largo de la región helicoidal de ambas cadenas son hidroxiladas por la prolil-4-hidroxilasa 1 (la cual actúa sobre el anillo de prolina en el carbono 4) y la lisil hidroxilasa 1 (LH1). Los residuos de hidroxilisina pueden subsecuentemente ser glicosilados. La prolil-3-hidroxilasa 1 (P3H1), actúa como parte de un complejo con la proteína asociada a cartílago (CRTAP) y ciclofilina B (CyPB), este complejo hidroxila el carbón-3 de residuos de prolina $\alpha 1$ (Pro986) y $\alpha 2$ (Pro707). La isomerización de las cadenas de prolil peptidil, es crucial para el plegamiento adecuado de la colágena el cual es catalizado por una isomerasa cis-trans prolil peptidil (PPIase) (Forlino & Marini, 2015). Estas modificaciones postraduccionales se detienen cuando el ensamblado de la triple hélice está completo (Van Dijk et al., 2011). Después del plegamiento de las moléculas de procolágena, estas son transportadas a través del aparato de Golgi y membrana plasmática a la matriz extracelular, donde ocurre la escisión de los propéptidos N y C terminal y las moléculas de triple hélice se agregan para formar fibrillas (ver figura 3). Entrecruzamientos covalentes se producen dentro y entre las moléculas de la triple hélice, en las fibrillas, las cuales convergen en fibras de colágena tipo 1 (ver figura 4) (Van Dijk et al., 2011).

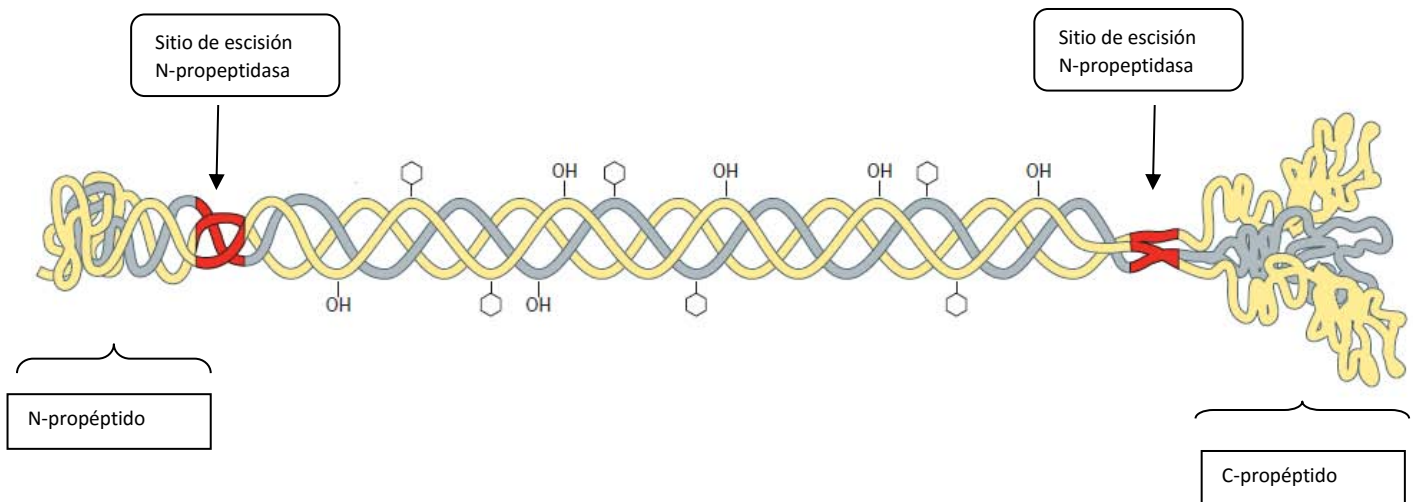


Figura 3. Estructura de la colágena en forma de triple hélice. En amarillo se observan las dos cadenas $\alpha 1$ y en gris se observa la cadena $\alpha 2$. Las flechas muestran los diferentes dominios en la proteína, los hexágonos representan los disacáridos de residuos de glucosa y galactosa frecuentemente unidos al grupo hidroxilo de los residuos de hidroxilisina. OH; grupo hidroxilo unido a los residuos de prolina o lisina. Modificada de Forlino & Marini, 2015.

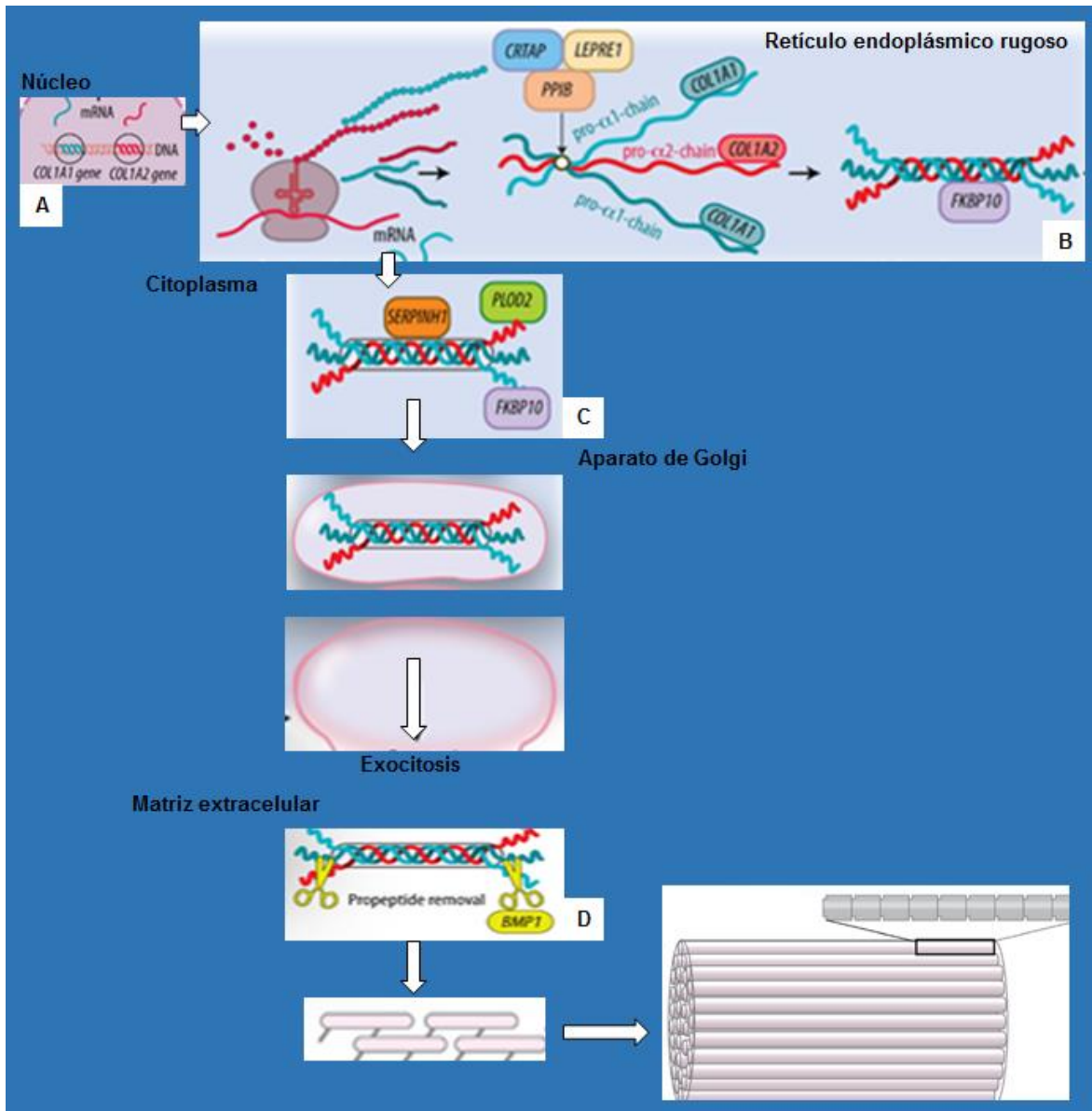


Figura 4. Biosíntesis de la colágena tipo 1 y genes participantes. Dentro del núcleo (A) los genes de la colágena, *COL1A1* y *COL1A2*, se encargan de sintetizar las cadenas de la procolágena tipo 1, posteriormente se transportan hacia el retículo endoplásmico rugoso (B), donde debido a la combinación de glicinas en cada tercer aminoácido ocurre el ensamblado de la triple hélice, para su adecuado plegamiento. Posteriormente son transportadas a través del aparato de Golgi (C) hacia la matriz extracelular (D) donde ocurre la escisión de los propéptidos N y C terminal y finalmente las moléculas de triple hélice se agregan para formar fibrillas, las cuales debido a entrecruzamientos covalentes convergen en fibras de colágena tipo 1. Modificado de Van Dijk & Sillence, 2014.

Defectos en genes que alteran la estructura de la colágena

Los defectos estructurales más comunes en la colágena tipo 1 causantes de OI son sustituciones de glicina en el dominio helicoidal. Las sustituciones de glicina repercuten en el plegamiento helicoidal, prolongando el tiempo de acceso para las modificaciones enzimáticas. Cada cadena α tiene una relación genotipo-fenotipo diferente, las sustituciones en la cadena lateral $\alpha 1$ cargada o ramificada, perturban la estabilidad de la hélice y dan predominantemente un fenotipo letal, así como las sustituciones en las dos principales regiones de unión a ligando cerca del extremo $\alpha 1$. Esto sugiere que las interacciones entre los monómeros de colágena y las proteínas de la matriz no-colágena, son cruciales. En la cadena $\alpha 2$, las sustituciones son principalmente no letales, sin embargo, ocho grupos letales a lo largo de la cadena se alinean con los sitios de unión a los proteoglicanos en las fibras de la colágena. Menos del 5% de las mutaciones que causan OI ocurren en el dominio C-propéptido de la procolágena, alterando la asociación de la cadena o su plegamiento (Forlino & Marini, 2015).

Los defectos primarios en la estructura del colágena, tienen consecuencias más severas para el metabolismo intracelular y estructura de la matriz, más que aquellas que reducen la cantidad de colágena normal (Forlino & Marini, 2015).

Alelos heterocigotos nulos de *COL1A1* resultan en la síntesis de una cantidad reducida (cerca de la mitad) de una colágena estructuralmente normal y causan la forma más leve de la enfermedad. Mutaciones nulas homocigotas en la cadena $\alpha 2$ causan síntomas que van, desde una forma severa de OI, hasta un síndrome parecido a Ehlers-Danlos (Forlino & Marini, 2015).

Defectos en genes que afectan el procesamiento de la colágena.

Después de su secreción, la molécula de procolágena se somete a un proceso de maduración extracelular en el cual el N-propéptido y C-propéptido son removidos por una proteasa específica. Posteriormente, las hélices de la colágena son capaces de ensamblarse espontáneamente en fibrillas en el tejido, que va a ser estabilizado

por entrecruzamientos. Mutaciones que alteran los sitios de escisión del propéptido causan variantes específicas de OI (Forlino & Marini, 2015).

El sitio de escisión del N-propéptido es codificado por el exón 6 de ambos genes, *COL1A1* y *COL1A2*, y es catalizado por la metalo enzima ADAMTS-2, la cual requiere un sustrato de conformación helicoidal. Una causa de procesamiento defectuoso del N-propéptido, también llamado salto del exón 6 a nivel de RNA, en el que se remueve el sitio de escisión de la procolágena, causa el síndrome de Elher Danlos tipo VII A, si se afecta *COL1A1*, o tipo B, si se afecta *COL1A2* (Forlino & Marini, 2015).

Una segunda causa de defecto en el procesamiento del N-propéptido implica mutaciones dominantes en los primeros 85 residuos de la región helicoidal de las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, que despliegan el sitio de escisión del N-propéptido contiguo, provocando OI combinada con síndrome de Ehlers Danlos. Mutaciones en esta región de *COL1A1* causan OI moderada a severa, mientras que síntomas relacionados a Elher-Danlos son causados de forma predominante por *COL1A2* (Forlino & Marini, 2015).

Mutaciones homocigotas en el gen *ADAMTS-2*, causan también, defecto en el procesamiento del N- propéptido, además de ser causa de OI, también son causa de síndrome de Ehlers-Danlos VIIC, la presentación de OI es más severa, ya que causa un procesamiento defectuoso de la colágena tipo 1 y 2, se caracteriza por fragilidad extrema en piel, facies características, laxitud ligamentaria, piel elástica, hernia umbilical y escleras azules (Forlino & Marini, 2015).

De forma similar, los defectos del procesamiento del C-propéptido se dan por sustituciones en el sitio de escisión y defectos en el procesamiento de las proteasas, que conducen colectivamente a los llamados OI de alta densidad ósea (Forlino & Marini, 2015).

La escisión del C-propéptido es más compleja que la del N-propéptido, ya que participan cuatro diferentes C-proteasas, y es modulado por una proteína potenciadora. Mutaciones en la principal enzima proteasa (C-BMP-1/mTLD),

resultan en una forma más severa de OI que la causada por defectos del sustrato. Esto se relaciona a que estas enzimas también procesan otras procolágenas y activan la lisil oxidasa, lo que provoca el origen de los entrecruzamientos (Forlino & Marini, 2015).

Defectos en genes que afectan las modificaciones postraduccionales de la colágena y su plegamiento.

La procolágena experimenta varias modificaciones postraduccionales durante su síntesis, las cuales son importantes para el plegamiento, secreción y ensamblaje en la matriz extracelular. Estas modificaciones están reguladas de forma sitio y tiempo específicos, la mayoría de estos pasos ocurren en el retículo endoplásmico.

El descubrimiento del complejo colágena prolil 3-hidroxilasa (P3H1), abrió la puerta a la comprensión de las formas raras de OI. Esta enzima causa la 3-hidroxilación de $\alpha 1$ en la colágena tipo 1. La P3HI se aisló como parte del complejo formado por las proteínas P3H1, CRTAP y CyPB. P3H1 es el componente activo catalítico, CRTAP está localizado de forma predominante en el retículo endoplásmico, en tanto que CyPB (isomerasa *cis-trans* peptidil-prolil o ciclofilina B) es importante para la conformación de la configuración prolil trans, que se requiere para el plegamiento de la proteína, siendo esta la limitante para el plegamiento de la colágena. El gen *TMEM38B*, que codifica para TRIC-B, forma un canal catiónico trimérico en la membrana del retículo endoplásmico, que se sincroniza con la liberación de inositol trifosfato, que es regulado por calcio (Forlino & Marini, 2015).

Genes implicados en el plegamiento y entrecruzamiento de la colágena

Otra inmunofilina del retículo endoplásmico rugoso, también crucial para la síntesis normal de la colágena, es PPlase FKBP65, la cual es codificada por *FKBP10*. FKBP65 tiene efectos de forma directa e indirecta sobre la procolágena, a través de la modificación en la colágena (Forlino & Marini, 2015).

El gen *PLOD2*, codifica para la enzima lisil hidroxilasa 2, quien asociada con FKBP65, se encargan de hidroxilar telopéptidos de lisina. En hueso, la hidroxilación del telopéptido de lisinas es necesario para generar enlaces cruzados entre las

moléculas de colágena y proporcionar estabilidad y resistencia a la tracción de las fibrillas. El segundo indicio es que las células con mutación en *FKBP10* depositan una cantidad reducida de colágena en la matriz extracelular, por lo que la hidroxilación de telopéptidos de lisina de la colágena en células mutantes se reduce al mínimo (Forlino & Marini, 2015).

Finalmente, HSP47 es una chaperona específica de la colágena codificada por *SERPINH1*, tiene un sitio de reconocimiento en el retículo endoplásmico rugoso para mediar la ida y venida de la proteína entre retículo endoplásmico y aparato de Golgi, que solo se une a la cadena de triple hélice (Forlino & Marini, 2015).

Genes relacionados con la osificación y mineralización ósea.

IFITM5 (proteína 5 transmembrana inducida por interferón), es un miembro de la familia IFITM. Tiene un único dominio transmembranal y un dominio C-terminal extracelular. IFITM5 está unido a la membrana a través de la palmoitilación de las cisteínas 52 y 53, comparte solo el 30% en identidad de aminoácidos con otros miembros de la familia y no es inducido por interferón. Se localiza predominantemente en la membrana plasmática de los osteoblastos y es expresado a lo largo de toda la vida, aunque su expresión disminuye con la edad.

SERPINF1 codifica para PEDF, que pertenece a la familia de inhibidores Serpin de la proteasa de serina, pero sin actividad inhibitoria de proteasa. PEDF es un potente factor anti-angiogénico expresado en diversas células, incluyendo los condrocitos en la placa de crecimiento, osteoblastos y células madre mesenquimales. En hueso, PEDF funciona a muchos niveles para mantener la homeostasis y regular la mineralización osteoide. PEDF afecta positivamente el desarrollo de los osteoblastos al favorecer la expresión de genes osteogénicos y el depósito mineral. También inhibe la maduración de los osteoclastos al estimular la expresión de osteoprotegerina. Por lo tanto, su ausencia incrementa el número de osteoclastos y la resorción ósea, favoreciendo la unión al receptor de osteoclastos RANK.

Defectos en el desarrollo de los osteoblastos

Tres genes implicados en la diferenciación de los osteoblastos están asociados a Osteogénesis Imperfecta: *WNT1*, *CEB3L1* y *SP7*. Mutaciones en cualquiera de estos tres genes se espera que causen una disminución en la expresión de la colágena tipo 1. Esto da como resultado osteopenia, y otras manifestaciones por alteración en la diferenciación de los osteoblastos tales como talla baja, fracturas frecuentes, compresión vertebral. El producto de *WNT1* pertenece a la familia WNT de proteínas secretoras de glucoproteínas, cuya unión a los receptores transmembranales LRP5, LRP6 y Frizzled, inicia una compleja vía de señalización intracelular en la vía canónica. La unión de WNT permite a la β -catenina citosólica escapar de la destrucción proteosómica y ser translocada al núcleo, donde activa la expresión de varios genes implicados en la formación de hueso.

El gen *CEB3L1* funciona predominantemente a nivel de osteoblastos, codifica para OASIS (sustancia inducida específicamente por un viejo astrocito), el cual es un factor de transcripción involucrado en la respuesta a presencia de proteínas mal plegadas.

Un tercer gen con un mecanismo potencial en osteoblastos es *SP7*, que codifica a osterix y se considera un gen diana en las vías de señalización de WNT (Forlino & Marini, 2015).

Osteogénesis Imperfecta de herencia Autosómica recesiva

Se estima que el 10% de los casos de OI pueden ser causados por variantes recesivas. Entre los genes causantes de estas formas se encuentran: *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *PLOD2*, *SP7* (Van Dijk et al., 2011).

El producto del gen *CRTAP* (cartilage-associated protein) con locus en 3p22.3, forma parte de un complejo de tres proteínas junto con P3H1 y CyPB. Este complejo se expresa en sistema esquelético por los condrocitos, osteoblastos y osteoclastos (Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, 2011). El ratón *Crtap* *-/-* desarrolla un desorden de tejido conectivo caracterizado por rizomelia (acortamiento proximal

de las extremidades), cifosis, deficiencia del crecimiento y osteopenia (Morello et al., 2006). Su función conocida es la hidroxilación de un único residuo de prolina en la posición 986 (P986) de la cadena pro- α 1, variantes en este gen causan OI tipo II-A. La mayoría de las variantes causan alelos nulos, las mutaciones de cambio en el marco de lectura resultan en ausencia de la proteína CRTAP y por tanto pérdida de la hidroxilación del residuo de prolina (Van Dijk et al., 2011). En humanos, mutaciones en *CRTAP*, son causantes del tipo VII de OI. La enfermedad se presenta como una osteocondrodistrofia moderada letal recesiva, con deficiencia de crecimiento y rizomelia, escleras normales, osteopenia severa con fracturas neonatales y huesos largos anchos.

El gen *LEPRE1* (Leucine proline-enriched proteoglycan 1/prolyl 3-hydroxylase 1), está localizado en 1p34.2. El producto de este gen contiene una secuencia KDEL (lisina, aspartato, glutamato y leucina), la cual funciona como péptido señal que impide que sea secretada por el retículo endoplásmico. La expresión de P3H1 se localiza en los tejidos ricos en fibras de colágena, que son abundantes durante el desarrollo (Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, 2011). La mayoría de las mutaciones conducen a una disminución en la transcripción y se ha observado en pacientes con OI tipo VII (Van Dijk et al., 2011). El tipo VIII se presenta como una OI letal, dentro de las características se encuentran, escleras blancas, rizomelia y pobre tubulización de los huesos largos. Los pacientes que sobreviven la infancia tienen densidad ósea muy disminuida, deficiencia de crecimiento severa y metáfisis ensanchadas. Una mutación con efecto fundador en África (c.1080+1G>T) se encuentra en aproximadamente la mitad de los casos de OI tipo VIII en ese continente (Byers & Pyott, 2012). El ratón *Lepre1* *-/-*, muestra un fenotipo más leve que en los humanos, aunque comparten la deficiencia en el crecimiento, rizomelia, disminución de la densidad ósea, presencia de condrocitos hipertróficos y anormales, además de retraso en la secreción de colágena de células en cultivo (Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, 2011).

El producto del gen *PPIB* (Peptidylprolyl isomerase B/Ciclophilin B), localizado en el locus 15q22.31, se encuentra unido un al complejo con P3H1 y CRTAP. Mutaciones

homocigotas causan disminución en la 3-hidroxilación, y en las modificaciones post traduccionales en la procolágena tipo 1, asimismo, se han confirmado mutaciones en otros pacientes con el tipo II, III y IV (Byers & Pyott, 2012). La isomerización de forma natural de la prolina ocurre en *cis*, la conformación en *trans* limita la velocidad del plegamiento. Mutaciones en este gen son causantes del tipo IX de OI, las mutaciones sin sentido llevan a codones de paro prematuro y un mal plegamiento proteico, que finalmente da como resultado un fenotipo letal (Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, 2011).

SERPINH1 (Serpín peptidasa inhibidor, clade H, member 1/heat shock protein 47) con locus en 11q13.5 codifica para una chaperona colágena específica que reside en el retículo endoplásmico. Esta proteína se une y acompaña a la molécula de procolágena junto con *PPIB* hacia el aparato de Golgi. En estudios de investigación se observó que los ratones *Serpinh1*^{-/-} se pierden durante la gestación. Esto demuestra que este gen se requiere para un adecuado desarrollo. Se conoce que mutaciones en este gen, son causantes de la OI tipo X, ya que causan defectos en la agregación intracelular y retraso en la secreción de colágena, con fibrillas anormales (Forlino, Cabral, Barnes, & Marini, 2011). El único paciente reportado con mutación en *SERPINH1* fue homocigoto para el alelo c.233T>C, p.Leu78Pro. Este paciente mostraba un fenotipo severo, escleras azules, dentinogénesis imperfecta, y dentro de las características atípicas se observó la presencia de ampollas en piel, estenosis pilórica y cálculos renales que requirieron nefrectomía (Christiansen et al., 2010).

FKBP10 (FK506 binding protein 65/ peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase FKBP10) localizado en el locus 17q21.2, codifica para una proteína que se localiza en el retículo endoplásmico y tiene actividad de chaperona para la colágena. Mutaciones en el marco de lectura de este gen son causantes de la llamada OI tipo XI, la cual se reportó por primera vez en pacientes con nacionalidad mexicana y turca. Todos los probandos mostraron OI deformante, fracturas de huesos largos, hiperlaxitud ligamentaria, platispondilia, escoliosis, escleras y dientes normales. Bioquímicamente, la colágena no muestra alteraciones en cuanto a su hidroxilación

y por tanto su plegamiento helicoidal es normal (Alanay et al., 2010). Mutaciones en este gen se asocian con retraso en la secreción de colágena, debido al defecto en la actividad de chaperona se han demostrado agregados intracelulares de colágena (Byers & Pyott, 2012). Se sugiere que el espectro fenotípico causado por mutaciones en este gen se sobrepone con el síndrome de Bruck, una entidad autosómica recesiva caracterizada por osteoporosis, contracturas articulares al nacimiento, fragilidad ósea y talla baja, antes conocida como “osteogénesis imperfecta con contracturas articulares congénitas” (Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, 2011).

EL gen *PLOD2* (Procollagen - lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2) con locus 3q24, codifica para la telopéptido lisis hidroxilasa específica del hueso (THL). Los individuos con mutaciones en este gen son clínicamente indistinguibles de las personas con síndrome de Bruck 1. Mutaciones en este gen resultan en una subhidroxilación de lisinas en el telopéptido de colágena, pero no de la triple hélice, lo cual conduce a un inadecuado entrecruzamiento de la colágena (Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, 2011). *SP7* (Transcriptor factor 7/osterix) con locus en 12q13.3, codifica para un factor de transcripción con dedos de zinc. Mutaciones en osterix, se espera que causen efectos devastadores en la diferenciación de los osteoblastos. Los ratones *Sp7*^{-/-} son letales en periodo perinatal, se observa pérdida de formación ósea endocondral e intramembranosa y reducción de la expresión de los marcadores de osteoblastos específicos de *COL1A1* tales como osteonectina y osteopontina (Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, 2011). Dos mutaciones heterocigotas en este gen dentro del marco de lectura, ocasionaron pérdida del dominio de zinc, y se reportaron en un niño egipcio que mostró un fenotipo moderadamente severo y disminución en la densidad ósea vertebral (Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, 2011). Mutaciones en *SERPINF1* (Pigmente epithelium-derived factor) localizado en el locus 17p13.3, se han reportado en pacientes con OI tipo VI. Dichos pacientes presentan un fenotipo esquelético grave, con una característica distintiva que se define en su histomorfometría ósea. Bajo el microscopio de luz polarizada la orientación normal de las fibrillas se pierde, observándose un patrón en forma de “escama de pez”,

orientando a un defecto en la mineralización ósea. Mutaciones sin sentido en este gen se observaron en tres pacientes con OI grave mediante secuenciación de exoma, mostrando que afectaban las modificaciones postraduccionales y secreción de colágena. En ratones nulos para el gen *Serpinf1*, se observa un fenotipo con alteraciones vasculares y epiteliales, sin alteraciones en hueso reportadas (Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, 2011).

Bases moleculares

De los 19 tipos de colágena conocidos en vertebrados, el tipo 1 es el más abundante y por lo tanto el más estudiado. Las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la colágena, son codificadas por loci diferentes, *COL1A1* y *COL1A2*, respectivamente. *COL1A1* comprende ~18 kb, y está situado en 17q21.3-q22. *COL1A2* es de ~38 Kb y está situado en 7q21.3-q22.1. Las cadenas α de colágena contienen 3 dominios, el N-terminal, el dominio de la colágena y el C-terminal (ver tabla 3).

Tabla 3. Dominios de la proteína colágena tipo 1 con su correspondiente número de aminoácidos que lo conforman, Modificada de Dagleish, 1997.

Dominio	Pro $\alpha 1$	Pro $\alpha 2$
N-terminal	161	79
Péptido señal	22	22
N- propéptido	139	57
Dominio de Colágena	1057	1040
N-telopéptido	17	11
Triple hélix	1014	1014
C- telopéptido	24	15
C- terminal		
C- propéptido	246	247

La característica más sorprendente de estos genes, es que los exones que codifican las porciones de la triple hélice de las cadenas de colágena son en su mayoría de 54 pb de longitud.

COL1A1 consiste de 51 exones (ver figura 5) y *COL1A2* de 52 exones (ver figura 6), (Dalglish, 1997). Hasta febrero del 2016, se habían descrito un total de 1693 variantes en *COL1A1* (ver tabla 4). Las mutaciones se encuentran a lo largo de todo el gen, sin encontrarse puntos calientes. Sin embargo, algunos exones presentan un mayor número de mutaciones, en orden descendente se encuentran los exones 37, 44, 11, 8, 38, 42, 15, 17, 7, 9, 19, 31, 25 y 18 (Ver tabla 6).

Tabla 4. Variantes encontradas en *COL1A1*, modificado de la base de datos de osteogénesis imperfecta y Ehlers-Danlos, www.le.ac.uk/ge/collagen/.

Variante	Número	Localización				%
		5'UTR	Codificantes	Intrones	3'UTR	
Sustituciones (sentido equivocado, sin sentido, sinónimas)	1329	0	1084	245	0	78.5
Deleciones	271	7	236	28	0	16.01
Duplicaciones	71	0	69	2	0	4.19
Inserciones	11	0	10	1	0	0.65
Inserciones/deleciones	11	0	7	4	0	0.65
Total	1693	7	1406	280	0	100

Hasta junio del 2016, en *COL1A2* se habían reportado un total de 961 variantes (ver tabla 5). También se observa que las mutaciones se encuentran a lo largo de todo el gen sin encontrarse puntos calientes. Sin embargo, se encuentran predominantemente en algunos exones, en orden descendente 19, 38, 17, 12, 24, 46, 37 (Ver tabla 6).

Tabla 5. Variantes encontradas en el gen *COL1A2*, modificado de la base de datos de osteogénesis imperfecta y Ehlers-Danlos.

Variante	Número	Localización				%
		5'UTR	Codificantes	Intrones	3'UTR	
Sustituciones (sentido equivocado, sin sentido, sinónima)	901	0	789	112	0	93.76
Deleciones	39	0	17	22	0	4.06
Duplicaciones	16	0	13	3	0	1.66
Inserciones/deleciones	5	0	5	0	0	0.52
Total	961	0	824	137	0	100

Tabla 6. Distribución de mutaciones según los exones en los genes *COL1A1* y *COL1A2*.

<i>COL1A1</i>			<i>COL1A2</i>		
Exón	No. de mutaciones reportadas	%	Exón	No. de mutaciones en el exón	%
1	14	0.98	1		
2	13	0.91	2		
3	2	0.14	3	1	0.12
4	1	0.07	4	1	0.12
5	28	1.97	5	1	0.12
6	9	0.63	6	3	0.36
7	28	1.97	7	4	0.48
8	51	3.59	8	10	1.20
9	31	2.18	9	6	0.72
10	7	0.49	10		
11	55	3.88	11	4	0.48

12	21	1.48	12	26	3.13
13	11	0.77	13	13	1.56
14	15	1.05	14	4	0.48
15	31	2.18	15	1	0.12
16	13	1.12	16	13	1.56
17	63	4.44	17	59	7.10
18	18	1.27	18	6	0.72
19	53	3.74	19	114	13.7
20	4	0.28	20	15	1.80
21	42	2.96	21	24	2.89
22	5	0.35	22	5	0.60
23	29	2.04	23	20	2.40
24	9	0.63	24	23	2.77
25	42	2.96	25	18	2.16
26	26	1.83	26	13	1.56
27	6	0.42	27	8	0.96
28	20	1.41	28	11	1.32
29	7	0.49	29	9	1.08
30	6	0.42	30	3	0.36
31	47	3.31	31	17	2.04
32	8	0.56	32	13	1.56
33/34	56	3.95	33	11	1.32
35	17	1.19	34	10	1.20
36	19	1.34	35	13	1.56
37	72	5.08	36	16	1.92
38	41	2.89	37	36	4.33
39	20	1.41	38	34	4.09
40	18	1.27	39	14	1.68
41	21	1.48	40	31	3.73
42	42	2.96	41	12	1.44

43	31	2.18	42	17	2.04
44	61	4.30	43	5	0.60
45	39	2.75	44	23	2.77
46	20	1.41	45	14	1.68
47	15	1.05	46	45	5.42
48	45	3.17	47	11	1.32
49	50	3.52	48	14	1.68
50	33	2.32	49	37	4.45
51	33	2.32	50	9	1.08
			51	17	2.04
			52	16	1.92

COL1A1

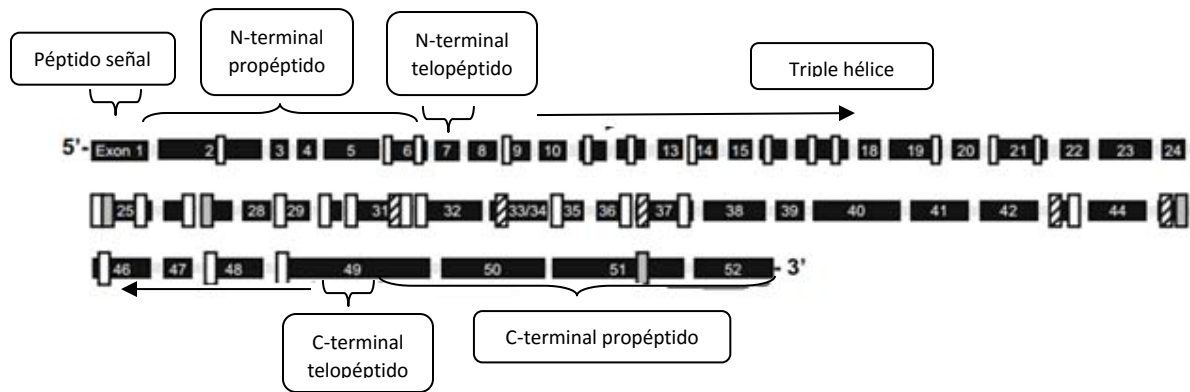


Figura 5. COL1A1, con flecha se señalan los dominios respecto a la estructura del gen, cada cuadro negro con su respectivo número representa los exones del gen. Los rectángulos blancos señalan la localización de las mutaciones reportadas en pacientes con fenotipo de OI tipo I, los rayados el tipo III y el gris el tipo IV, modificado de Hald et al., 2016.

COL1A2

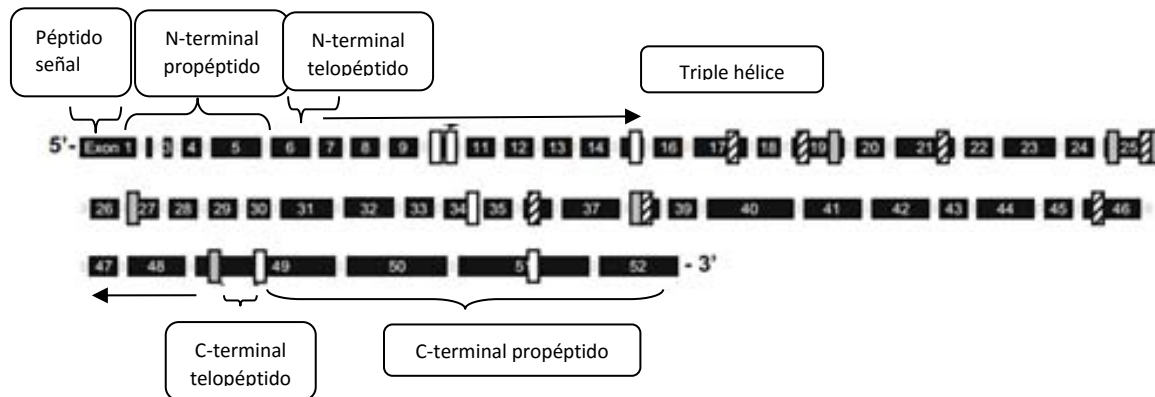


Figura 6. *COL1A2*, con flecha se señalan los dominios respecto a la estructura del gen, cada cuadro negro con su respectivo número representa los exones del gen. Los rectángulos blancos señalan la localización de las mutaciones reportadas en pacientes con fenotipo de OI tipo I, los rayados el tipo III y el gris el tipo IV, modificado de Hald et al., 2016.

Se ha observado que pacientes con mutaciones que caen dentro del dominio helicoidal de la cadena $\alpha 1$ tienden a presentar escleras azules con mayor frecuencia (75%), que aquellos con mutaciones en la cadena $\alpha 2$ (57%). También se ha relacionado que mutaciones que afectan los primeros 120 aminoácidos en el dominio de triple hélice, se relacionan con la presencia de escleras azules (Amor, Glorieux, & Rauch, 2011).

Entre los pacientes que comparten la misma mutación en *COL1A1*, la concordancia para el fenotipo en la esclera fue menor respecto al fenotipo dental. Esto puede estar dado a que la presencia de escleras azules es una característica más variable que la dentinogénesis imperfecta y a que en algunos pacientes el grado de coloración de la esclera tiende a disminuir con la edad (Amor, Glorieux, & Rauch, 2011).

En relación a la presencia de dentinogénesis imperfecta, la mayoría de los pacientes con esta característica presentan un defecto cualitativo en la colágena (96%), mientras que una minoría tiene un defecto cuantitativo (4%). La prevalencia de DI no depende de la cadena que presente la mutación (71% vs 66%). Sin embargo, las sustituciones de arginina presentaron una menor asociación a DI (25%) respecto a las sustituciones de serina (89%). Además, las mutaciones que afectan los primeros

120 aminoácidos, en el dominio de triple hélice no se relacionan con DI (Amor, Glorieux, & Rauch, 2011).

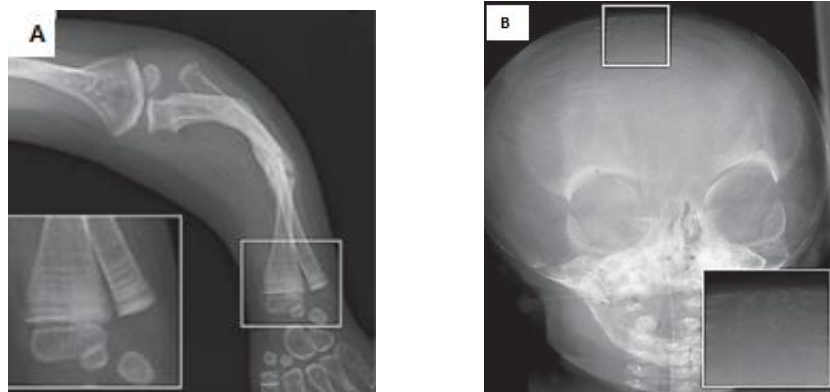
La prevalencia de huesos wormianos depende fuertemente del genotipo. Se observó que están presentes en el 29% de los pacientes con mutaciones de haploinsuficiencia, en 96% de los que tienen mutaciones en el dominio helicoidal de la cadena $\alpha 1$ y 72% de la cadena $\alpha 2$, en 48% de los pacientes con mutaciones en el sitio de corte y empalme y 33% con mutaciones en el C-propéptido.

Respecto a la densidad de la mineralización ósea, se encontró un Z-score mayor en aquellos pacientes con mutaciones de haploinsuficiencia, que en los de mutaciones en el dominio helicoidal de la cadena $\alpha 1$ ó $\alpha 2$ (Amor, Glorieux, & Rauch, 2011).

Diagnóstico

El diagnóstico inicial está basado principalmente en las características clínicas y radiológicas. La presencia de fracturas debidas a un trauma leve, deformidades óseas, encorvamiento de los huesos largos y deficiencia para crecer, son las características principales. Dependiendo de la edad y severidad, las características esqueléticas pueden incluir macrocefalia, facie triangular, hipoplasia medio facial, dentinogénesis imperfecta, deformidades en la pared torácica como pectum excavatum o carinatum, escoliosis o cifosis.

Las radiografías muestran osteopenia generalizada y alguna combinación de angulación y encorvamiento de los huesos largos, entre otras. (Figura 7)



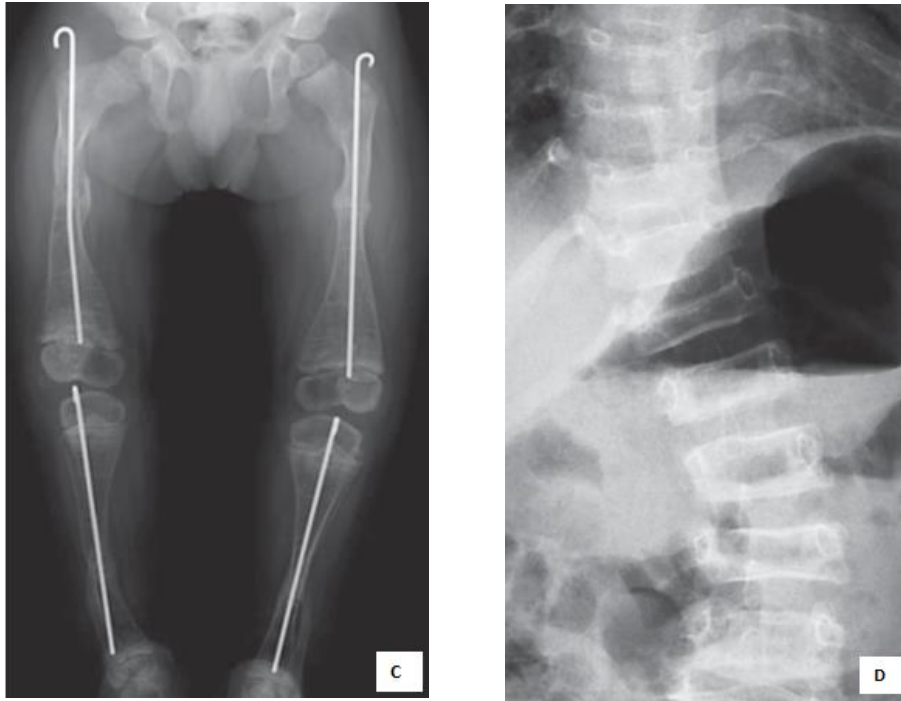


Figura 7. Ejemplos de lesiones secundarias a OI. A, Radiografía de brazo izquierdo de un paciente con diagnóstico de OI tipo III, donde se observa la metáfisis ensanchada del húmero, fractura en tercio medio del radio y cúbito, además de dislocación de la cabeza del radio y múltiples fracturas por compresión en tercio distal de radio y cúbito. B, Radiografía de cráneo AP con presencia de huesos wormianos (zona en recuadro) C, Radiografía AP de extremidades inferiores con osteopenia generalizada y múltiples fracturas las cuales requirieron intervención quirúrgica, con uso de clavos intramedulares. D, Radiografía de columna vertebral AP que muestra platispondilia y escoliosis.

La OI puede ser difícil de discriminar con la osteoporosis de inicio temprano en adultos, o en menores de edad víctimas de maltrato físico.

En los pacientes con OI I-IV la histomorfometría ósea revela disminución del volumen óseo y del número de trabéculas con cinética de alta rotación elevada, mientras que la histología es distintiva en el tipo V y VI (Forlino & Marini, 2015).

La OI es el arquetipo de una displasia esquelética, para la cual el diagnóstico molecular se basa en la secuenciación de siguiente generación (Bonafe et al., 2015). Por razones de economía, el tamizaje de los genes de *COL1A1* y *COL1A2* se recomienda en familias con un solo afectado, seguida de una secuenciación completa de los otros genes causantes de OI, en caso de resultar el estudio negativo. Cuando más de un hijo se encuentra afectado en la familia, la realización del panel de genes causantes de OI representa una mejor opción. Un diagnóstico

molecular es muy útil para dar el consejo genético acerca del pronóstico, riesgo de recurrencia, heredabilidad y respuesta a tratamiento (Forlino & Marini, 2015).

Tratamiento

EL tratamiento de OI depende de la severidad de la enfermedad y la edad del paciente, en cualquier caso, una estrategia de tratamiento debe proporcionar el máximo de la función a largo plazo y autonomía. Los objetivos de tratamiento se pueden reducir a tres situaciones típicas: la forma leve (tipo I), en la que el objetivo es llegar a una expectativa de “vida normal”, las formas moderadas y graves (tipos III-IX), en la que el objetivo es la “autonomía”, y la forma perinatal letal (tipo II), en la que el objetivo es la supervivencia al nacimiento. El enfoque de una enfermedad tan heterogénea debe ser global y por tanto ser multidisciplinario (Sathasivam, 2011).

Los objetivos del tratamiento de la OI son maximizar la movilidad y vida cotidiana, disminuir el dolor óseo y fragilidad ósea. EL grado de intervención depende de la gravedad del fenotipo clínico (Harrington, Sochett, & Howard, 2014).

- **Rehabilitación:** La terapia física se utiliza para guiar la adquisición de las habilidades motoras de los niños más gravemente afectados, es importante maximizar el ejercicio a base de levantamiento de peso para evitar fracturas o durante la recuperación de fracturas. La hidroterapia es un medio útil de retorno gradual a la carga de peso, el uso de la silla de ruedas y andaderas se prescribe de acuerdo a las necesidades del niño, con un equilibrio entre la movilidad y estar sentado. Los pacientes con deformidades de extremidades superiores pueden beneficiarse de la evaluación de terapia ocupacional que es útil para el cuidado personal y realización de las actividades diarias (Harrington et al., 2014).
- **Tratamiento quirúrgico:** En un niño con OI, las fracturas son la razón más común para consultar a un cirujano. El tiempo de curación para los niños con OI es normal a pesar del tratamiento con bifosfonatos, es importante evitar la inmovilización excesiva ya que lleva a debilidad, rigidez muscular y osteopenia secundaria a la falta de uso de los huesos, lo que a su vez puede

conducir a más fracturas. Las fracturas en lactantes se tratan de la forma más simple con inmovilización, con el objetivo de proporcionar comodidad a la extremidad mientras se forma el callo óseo inicial. Las fracturas sanan rápidamente en los recién nacidos (2-3 semanas). Los niños pequeños y mayores varían considerablemente en el número de fracturas y el grado de deformidad resultante, en general para la OI tipo I, se tratan de forma conservadora con uso de yeso, la fijación con placa se debe evitar ya que hay un riesgo posterior de fractura peri-implante. La deformidad de fémur y tibia se puede tratar con osteotomía y clavo intramedular, ya que mantiene una alineación mecánica recta y adecuado soporte del hueso (Harrington et al., 2014).

- Tratamiento farmacológico: en niños con OI se debe evaluar que en la dieta haya una suficiente ingesta de calcio y 25-hidroxivitamina D, ya que hay evidencia de que uno de cada cuatro niños con OI tiene deficiencia de vitamina D. Además, las concentraciones séricas de 25-hidroxivitamina D se asocian de forma independiente con la densidad de la mineralización ósea (Harrington et al., 2014).

Los bifosfonatos son drogas anti resorptivas, que se caracterizan por ser análogos sintéticos del pirofosfato. Estos se depositan en la superficie del hueso, donde su endocitosis por precursores de osteoclastos induce la muerte celular por apoptosis, además de unirse a los cristales de hidroxiapatita en el hueso mineralizado. La decisión de iniciar esta farmacoterapia depende de la gravedad clínica, presencia de deformidad en huesos largos, dolor óseo y fracturas óseas, más que el estado de mineralización ósea y tipo de mutación encontrado en el gen de la colágena (Harrington et al., 2014). Por lo tanto, su uso tiene como objetivo aumentar el volumen óseo, contrarrestando el estado celular de alta producción de masa ósea en la OI clásica. El hueso nuevo contiene aún colágena defectuosa en el tipo clásico, pero la hipótesis detrás del tratamiento es que un mayor volumen de hueso (aún con deterioro en su calidad) sería benéfico a la fuerza

ósea. La mayoría de los niños con OI tienen efectos vertebrales positivos, incluyendo aumento en la densidad ósea, con una puntuación en el Z score de aproximadamente 1.5 en el primer año de tratamiento con bifosfonatos y disminución en las compresiones vertebrales y número de fracturas. Una probable explicación para la reducción de fracturas, es que la calidad del hueso se reduce por la administración de bifosfonatos. La inhibición a largo plazo de los osteoclastos lleva un hueso no dinámico, en el que a menudo las micro grietas no se reparan. Las micro fisuras y focos de retención de cartilago mineralizado provenientes de las infusiones cíclicas de bifosfonatos, pueden facilitar la propagación de las grietas (Forlino & Marini, 2015). En general, la actividad de los bifosfonatos está dirigida a la reducción de la actividad de los osteoclastos, el tratamiento vía intravenosa se ha convertido en el estándar de oro para los niños con OI moderada a severa (Van Dijk & Sillence, 2014). Ensayos controlados y observacionales han demostrado que los bifosfonatos aumentan significativamente la densidad mineral ósea, con la mayor ganancia obtenida en los primeros 2 a 4 años. De igual forma, documentan una reducción en el número de fracturas en huesos largos y dolor en los huesos, así como mejoría en la morfología vertebral. Sin embargo, estos resultados no han sido apoyados por estudios controlados aleatorios. Sigue aún en duda el plan óptimo acerca de la duración y su dosificación (Monti et al., 2010). Suspender el tratamiento mientras se encuentra en etapa de crecimiento, puede resultar en reducción del contenido mineral del hueso metafisiario y aumento de riesgo de fracturas en la unión metáfisis-diáfisis. Dentro de los efectos adversos, se ha observado hasta en 85% de los niños, síntomas gripales después de la primera dosis e hipocalcemia transitoria. La disminución de la remodelación ósea asociada al tratamiento, puede retrasar la curación del sitio de osteotomía con clavo intramedular. La osteonecrosis de la mandíbula se ha descrito en pacientes adultos, pero no se ha reportado en pacientes pediátricos (Harrington et al., 2014).

La hormona de crecimiento se ha probado en ensayos clínicos debido a sus potenciales efectos anabólicos en hueso, a través de la estimulación de los osteoblastos, síntesis de colágena y crecimiento óseo. La deficiencia de ésta hormona es poco común en niños con OI, no obstante, el tratamiento con hormona de crecimiento puede aumentar su velocidad de crecimiento, aunque no existen datos sobre su efecto en la talla adulta final. Esta estrategia ha demostrado efecto significativo al aumentar la densidad mineral ósea, sola o en combinación con bifosfonatos, pero no ha demostrado disminuir la tasa de fracturas. No hay pruebas suficientes para apoyar el uso de hormona de crecimiento en niños con esta enfermedad (Harrington et al., 2014).

- Terapias futuras potenciales: Inhibidores del receptor activador del factor nuclear kappa B, como el denosumab, inhiben la formación de osteoclastos y degradación de hueso. En un modelo animal de ratón con OI, el denosumab mostró aumento en la densidad ósea, de la cortical, y disminución de fracturas. Hay un estudio de 4 niños con OI tipo VI, donde se demostró que el denosumab normaliza marcadores de resorción ósea previamente elevados, sin embargo, son necesarios aún más datos respecto a su efecto en la tasa de fracturas y dolor óseo (Harrington et al., 2014).

Los fármacos con acción anabólica en la formación de hueso, están en fase experimental en modelos animales con OI. Estos nuevos fármacos son anticuerpos. Uno contra esclerostina que es un regulador negativo de la formación de hueso en la ruta Wnt; y otro contra el factor de crecimiento transformante β (Dickkopf-1), que es un coordinador de la remodelación ósea producida por los osteoblastos (Forlino & Marini, 2015). El tratamiento con anticuerpos anti-esclerostina en ratones con OI, ha mostrado mejora de la fragilidad en huesos largos y puede ofrecer una nueva terapia para niños con OI en el futuro (Harrington et al., 2014).

Derivado de lo anterior, se puede concluir que los agentes farmacológicos actuales, no corrigen la causa primaria subyacente de OI, existen investigaciones en curso donde se busca la terapia génica y molecular. Enfoques en modelos animales incluyen la regulación a la baja de la expresión del alelo mutante a través de RNA pequeños interferentes o ribozimas. Las infusiones de células madre mesénquimales con potencial de desarrollar osteoblastos, han mostrado mejoría en los fenotipos en hueso de modelos de ratones con OI (Harrington et al., 2014).

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de OI depende en gran medida de la edad en que se evalúa al individuo.

In útero, el ultrasonido o características radiológicas pueden llevar a considerar:

- **Hipofosfatasia:** se caracteriza por una mineralización ósea defectuosa de hueso y/o dientes en presencia de actividad baja de fosfatasa alcalina en suero. Las características clínicas varían desde la muerte fetal sin mineralización ósea, hasta el extremo de fracturas patológicas en extremidades inferiores en edad adulta. Al menos seis formas clínicas son reconocidas, basándose en la edad al momento del diagnóstico y severidad de las características clínicas, siendo éstas: 1) hipofosfatasia perinatal (letal), caracterizada por insuficiencia respiratoria e hipercalcemia. 2) Hipofosfatasia perinatal benigna, con manifestaciones esqueléticas prenatales que se resuelven lentamente en la infancia o edad adulta. 3) Hipofosfatasia infantil, con inicio de los síntomas entre el nacimiento y seis meses con raquitismo sin elevación sérica de la fosfatasa alcalina. 4) Hipofosfatasia en la infancia, con baja mineralización ósea para la edad, acompañada de raquitismo y fracturas inexplicables. 5) Hipofosfatasia de inicio en la edad adulta, caracterizada por pérdida temprana de la dentición y fracturas de estrés y pseudo fracturas en extremidades. 6) Odontofosfatasia, caracterizada por pérdida prematura de los dientes primarios y/o caries dentales graves como un hallazgo aislado o como parte de las formas previas de hipofosfatasia.

- Displasia tanatofórica: es una displasia esquelética con acortamiento de las extremidades. Dentro de las características ultrasonográficas se observa acortamiento de huesos largos, visible desde las 12-14 semanas de gestación (sdg), en el ultrasonido de segundo y tercer trimestre se muestra deficiencia en el crecimiento de la longitud del fémur por debajo del percentil 5, reconocible a las 20 sdg, columna vertebral y cráneo con adecuada osificación, platispondilia, cavidad torácica con costillas estrechas, polihidramnios y fémures arqueados (tipo I), cráneo en trébol (tipo II) y en ocasiones macrocefalia relativa. Hasta en 99% de los casos con displasia tanatofórica tipo I, y más del 99% de los casos del tipo II, es posible identificar una mutación en el gen *FGFR3*.
- Displasia campomélica: es una osteocondrodisplasia caracterizada por dismorfias faciales distintivas, secuencia de Pierre Robin con paladar hendido, acortamiento y arqueamiento de huesos largos y pie equino varo. Otros hallazgos incluyen laringotraqueomalacia con compromiso respiratorio, genitales ambiguos, reversión sexual en pacientes con cariotipo 46, XY. La mutación causante es autosómica dominante y generalmente aparece *de novo* en el gen *SOX9*.
- Acondrogénesis tipo 1B: se caracteriza por extremidades muy cortas con dedos de los pies pequeños, hipoplasia de tórax, abdomen protuberante, aspecto fetal hidrópico causado por la abundancia de tejido blando en relación con un esqueleto corto. El único gen asociado es *SLC26A2*.

Durante la infancia los principales diagnósticos son:

- Trauma no accidental (maltrato infantil): La OI debe distinguirse del maltrato físico infantil o traumatismo no accidental. La violencia física en contra de infantes, como causa de fracturas (sin lesión cerebral), se presenta más frecuente en menores de 12 meses (20.4%), disminuyendo a 7.1% para los 12 a 23 meses de edad y 2.1% entre los 24 y 35 meses. En el año 2013, Leventhal y colaboradores estimaron que, en la población norteamericana, la OI representa el 0.85% del total de pacientes con fracturas; por lo que una

adecuada historia clínica, interrogatorio de antecedentes familiares, exploración física, toma de radiografías y curso clínico, nos deben guiar a diferenciarla de aquellas causadas por maltrato infantil. La superposición de las características incluye fracturas recurrentes, fracturas que no coinciden con el mecanismo de lesión y hallazgo de fracturas a distintas edades y en diferentes etapas de consolidación. Las fracturas metafisiarias y de costillas se consideran prácticamente patognomónicas del abuso infantil, aunque pueden presentarse en OI. Dentro de la historia familiar, las familias con sospecha de un posible abuso infantil, a menudo proporcionan un historial de fracturas frecuentes no verificadas.

- Síndrome de Bruck: con herencia autosómica recesiva, caracterizada por fragilidad ósea, contracturas articulares congénitas, pie equino varo, escleras azules o de color normal y presencia de huesos wormianos.
- Síndrome Cole-Carpenter: se caracteriza por deformidades óseas, múltiples fracturas, proptosis ocular, craneosinostosis, abombamiento frontal e hidrocefalia.
- Síndrome Hadju-Cheney: se identifica por talla baja, falla para crecer, hipoacusia conductiva, dismorfias faciales, pérdida temprana de los dientes, anomalías genitourinarias, falla en la osificación de las suturas, impresión basilar, anormalidades vertebrales, cifoscoliosis, inestabilidad cervical, laxitud articular, dislocación de la cabeza del radio, acroosteolisis e hirsutismo.
- Osteoporosis juvenil idiopática: típicamente se presenta en adolescentes con fracturas y osteoporosis. La susceptibilidad a fracturas y osteoporosis usualmente se resuelve espontáneamente en la pubertad. La etiología es desconocida.
- Dentinogénesis imperfecta: La cual se puede presentar de forma esporádica o familiar por mutaciones en el gen *DSSP* localizado en el cromosoma 4.

Desordenes alélicos:

- Enfermedad de Caffey: Se caracteriza por la irritabilidad, dolor, fragilidad, hiperestesia, así como hinchazón y enrojecimiento de los tejidos blandos, implicando una o más áreas del cuerpo. Normalmente, en los estadios más iniciales, se presentan cambios sistémicos con fiebre. El dolor puede ser tan severo que causa pseudoparálisis, y la implicación de nervios individuales puede resultar en parálisis. Otros signos clínicos descritos incluyen disfagia y obstrucción nasal. Se cree que la herencia es autosómica dominante en algunos casos. Recientemente, en casos familiares se identificaron mutaciones en *COL1A1*.
- Síndrome de Ehlers-Danlos clásico: el cual incluye el tipo I y II, se caracteriza por cicatrización anormal, hiperlaxitud articular y en piel. Los huesos no son frágiles, ni presentan tendencia a fracturarse. El tipo clásico tiene herencia autosómica dominante, causada por mutaciones en *COL5A1* y *COL5A1*, sin embargo, se han reportado casos por mutaciones en *COL1A1*.
- Osteoporosis: La variante Sp1 en *COL1A1*, ha demostrado afectar la densidad ósea y calidad del hueso, lo que los predispone a fracturas, principalmente vertebrales.

Objetivos:

Objetivo General

Revisión clínica y radiológica de una muestra de pacientes de población mexicana con diagnóstico de Osteogénesis Imperfecta e identificación de mutaciones causantes en de esta enfermedad en los exones 8, 11, 15, 33/34, 37 y 44 del gen *COL1A1*

Implementación de la técnica PCR punto final y secuenciación Sanger como herramienta de diagnóstico dentro del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Objetivos específicos

- Realizar un análisis de los datos clínicos mediante la revisión de historia clínica y radiológica de cada paciente relacionado con la enfermedad.
- Clasificación de los pacientes dentro de los tipos I – IV según Sillence.
- Estandarizar la metodología para la amplificación y secuenciación de los exones 8, 11, 15, 33/34, 37 y 44 del gen *COL 1A1*, mediante PCR punto final y secuenciación tipo Sanger.
- Análisis de la frecuencia de las mutaciones en los exones previamente descritos del gen *COL1A1*.
- Investigar la correlación genotipo–fenotipo en pacientes con Osteogénesis Imperfecta.

Planteamiento del problema y justificación:

La Osteogénesis Imperfecta es una enfermedad con una prevalencia aproximada, considerando todos los tipos, de 6-7:100,000 individuos. Se trata de una enfermedad que causa una discapacidad severa, un diagnóstico oportuno lleva a una evaluación y manejo temprano y adecuado a fin de tener una mejor calidad de vida y disminución de las complicaciones.

Actualmente en México no se tiene implementada la técnica para la confirmación molecular de la sospecha diagnóstica de ésta enfermedad.

Hipótesis

En la literatura se refiere que el 90% de los casos de Osteogénesis Imperfecta se debe a mutaciones en los genes *COL1A1* y *COL1A2*. Se calcula que aproximadamente 5-70% de los casos son por mutaciones en *COL1A1* por lo que se espera encontrar una proporción similar a lo referido en la literatura.

Diseño de estudio

Transversal, descriptivo y observacional.

Tamaño de la muestra

A conveniencia. Se captarán los pacientes de la población del Instituto Nacional de Rehabilitación y pacientes enviados de hospitales externos que cuenten con datos clínicos y radiológicos de Osteogénesis Imperfecta.

Análisis y métodos estadísticos de los datos

Se presentará estadística descriptiva.

Población del estudio

Criterios de inclusión:

- Ser pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación con expediente clínico, o de un hospital externo con expediente vigente.
- Haber sido valorados por parte del servicio de Genética Médica de alguna de las instituciones participantes.
- Tener características clínicas compatibles con Osteogénesis Imperfecta.
- Tener perfil radiológico completo con características compatibles con Osteogénesis Imperfecta.
- Pacientes de cualquier sexo y edad.
- Pacientes dentro de los tipos I-IV de la clasificación de Sillence.

Criterios de exclusión:

- No tener expediente clínico del Instituto Nacional de Rehabilitación u Hospital de referencia.
- Pacientes que no hayan sido valorados por un servicio de Genética Médica.
- No presentar características clínicas ni radiológicas compatibles con Osteogénesis Imperfecta.

Criterios de eliminación

- Pacientes que no acepten participar en el estudio.

Metodología

Toma de muestra sanguínea

- Limpieza y desinfección de la zona a puncionar con una torunda de alcohol.
- Con jeringa estéril se toma muestra de sangre periférica 5 ml.
- La muestra se recolecta en un tubo con EDTA.

Extracción de ADN (Gentra Puregene Blood Kit) 3 ml. de sangre.

Para la extracción de ADN se utilizó el Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen), utilizando el protocolo recomendado por el fabricante:

- Se agregaron 900 μ l de la solución lisis RBC en un tubo de 1.5 ml.
- Se agregaron 300 μ l de sangre total al tubo, y se mezcló invirtiendo 10 veces.
- Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Se invirtió el tubo al menos una vez durante la incubación.
- Se centrifugó a 2000x g por 2 min para sedimentar los leucocitos.
- Se desechó cuidadosamente el sobrenadante con la pipeta o decantándolo, dejando aproximadamente 10 μ l de líquido residual y el botón de leucocitos.
- Se agitó el tubo vigorosamente en el vórtex y se resuspendió el botón leucocitario en el líquido residual.
- Se agitó para facilitar la lisis celular en la siguiente etapa.

- Se agregaron 300 μl de solución de lisis celular, y se pipeteó para lisar las células durante 10 segundos.
 - Por lo general, no se requirió de incubación, sin embargo, si se observaban grumos celulares se incubaba a 37°C hasta que la solución fuera homogénea.
- Se agregaron 100 μl de solución de precipitado de proteínas, y se agitó vigorosamente durante 20 segundos a alta velocidad.
- Se centrifugó durante 5 min a 2,000 rpm.
 - Los precipitados formaban condensados de color marrón oscuro.
 - Si los precipitados de proteínas no estaban condensados, era necesario incubar en hielo durante 5 min y repetir la centrifugación.
- Se adicionaron 300 μl de isopropanolol en un tubo limpio de 1.5 ml, y se agregó al sobrenadante de la etapa anterior cuidadosamente.
 - Se aseguró que el sedimento de proteína no se desprendiera durante el vertido.
- Se mezcló invirtiendo suavemente 50 veces hasta que el ADN fue visible como hilos.
- Se centrifugó por 3 min a 2,000 x g.
 - El ADN fue visible como un pequeño sedimento blanco.
- Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante, y se drenó el tubo invirtiéndolo sobre una hoja limpia de papel absorbente, se tuvo cuidado de que el sedimento permaneciera en el tubo.
- Se añadieron 300 μl de etanol al 70% y se invirtió varias veces para lavar el sedimento de ADN.
- Se centrifugó durante 1 min a 2,000 x g.
- Se desechó cuidadosamente el sobrenadante, volteando el tubo en un pedazo de papel absorbente limpio, se tuvo cuidado que el botón permaneciera en el tubo.
 - Se dejó secar al aire el sedimento por 5-10 min.
 - Se evitó el exceso de secado del sedimento de ADN, pues se vuelve difícil de disolver.

- Se añadieron 100 µl de solución de hidratación de ADN y se vortexeó durante 5 segundos a velocidad media para mezclarlo
- Se incubó a 65°C por 1 h para que se disolviera el ADN

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los exones 8, 11, 15, 33/34, 37 y 44 de *COL1A1*, se realizó utilizando los oligonucleótidos previamente descritos por Jarmo Körkkö y cols (Körkkö et al., 1998), indicados en la tabla 7.

Tabla 7. Oligonucleótidos y correspondiente temperatura de alineamiento utilizados en el análisis de gen *COL1A1* en este estudio.

Gen	Primer	Secuencia	Temperatura
<i>COL1A1</i>	OIA1E8-F	5'- TGG AGG GAA GAC TGG GAT GAG -3'	65° C
	OIA1E8-R	5'- AAG ACC CAG GCC TGG GAG TTC TTC T – 3'	65° C
	OIA1E11- F	5'- CTG AAC CTG GGC TTC ACT GCA C -3'	64° C
	OIA1E11- R	5'- GAT GTC CAC TCT CTG GCC CTT G -3'	64° C
	OIA1E15-F	5'- GAT CCC TGA GCT CTG GAA GGG GCT C -3'	65° C
	OIA1E15-R	5'- GAG ATG GCA GCT GCA AGT CAC -3'	65° C
	OIA1E33/34-F	5'- CCT CTC AGG AAA CCC AGA CAC AAG CA -3'	64°C
	OIA1E33/34-R	5'- GTT CCC AGG TTG ACA GCT CAG -3'	64°C
	OIA1E37-F	5'- TGCCTCCATTACTGCTCCTCC -3'	62°C
	OIA1E37-R	5'- TAGGAGAGCACAGAGGCATCAAG -3'	62°C
	OIA1E44-F	5'- GCA ACA CTC CAT GAC CAC AGC -3'	62° C
	OIA1E44-R	5'- CCT GCC TGG GTG AAG TCC GAC -3'	62° C

Los componentes de cada reacción de PCR de 10 μ l se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Componentes de la reacción de PCR

	1x
Agua bidestilada	3.3 μ l
Buffer 10 x	1 μ l
MgCl₂ 25 μM	0.6 μ l
dNTPs 2 μM	1 μ l
Oligonucleótidos F 10 μM	0.5 μ l
Oligonucleótidos R 10 μM	0.5 μ l
ADN (50 ng/μl)	3 μ l
Taq Polimerasa 5 u/μl	0.1 μ l
Total	10 μ l

Se preparó el máster mix en tubos de 500 μ l, de acuerdo al número de muestras a analizar. Las muestras se colocaron en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) y se programó de la siguiente manera (ver figura 8):

a) Tiempo de desnaturalización inicial

- Temperatura 95°C
- Tiempo de 5 minutos

35 ciclos con las siguientes condiciones:

b) Etapa de desnaturalización

- Temperatura 95°C
- Tiempo 30 segundos

c) Etapa de alineamiento/hibridación

- Temperatura variable según los oligonucleótidos (ver tabla 7).
- Tiempo 15 segundos

d) Etapa de extensión/elongación

-Temperatura 72°C

-Tiempo 1 minuto

e) Fase final de extensión

- Temperatura 72 °C
- Tiempo 7 minutos

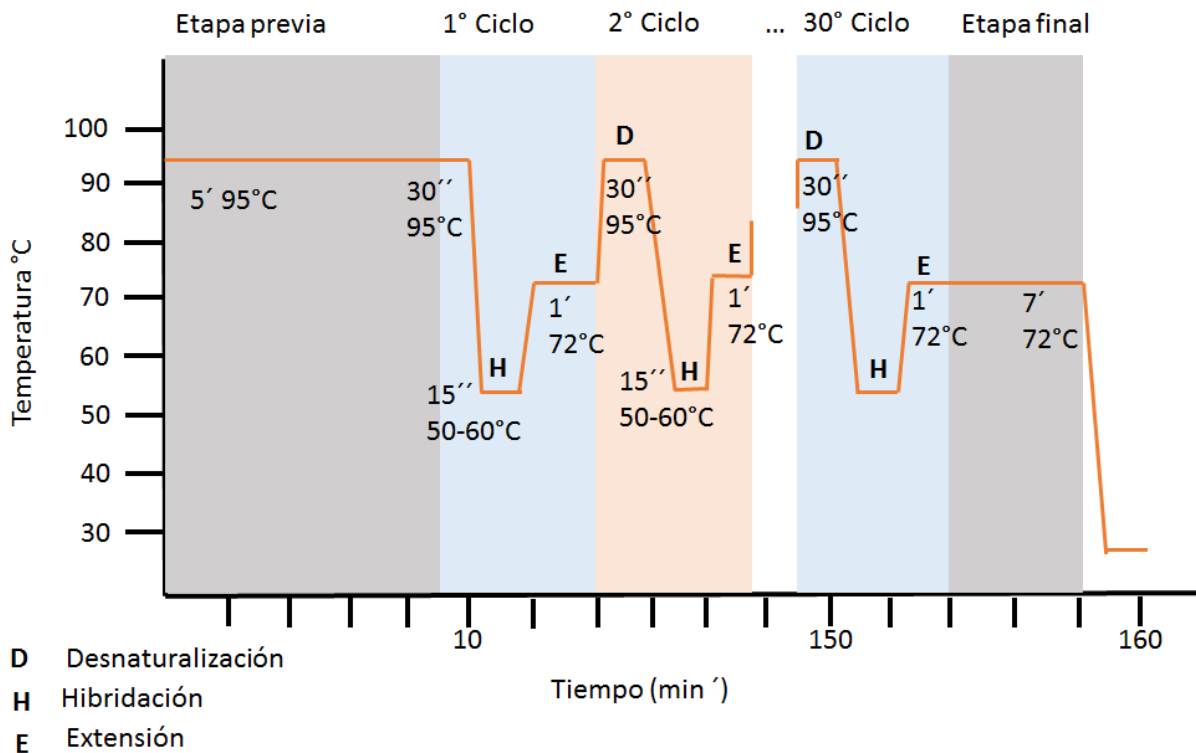


Figura 8. Fases y condiciones de la PCR punto final, utilizadas en las muestras.

Electroforesis en gel de agarosa

Elaboración del gel de agarosa para la electroforesis

- Se tomó un matraz limpio y se agregaron 100 ml de buffer TAE 0.5X (tris-acetato-EDTA).
- Se disolvió 1.5 gr de agarosa para obtener una concentración del 1.5%
- Se calentó en el horno de microondas y se agitó ligeramente hasta que se disolviera la agarosa.
- Se preparó la cámara de electroforesis, colocando un peine para formar múltiples pozos.

- Se añadió a la solución de agarosa 2µl de GelRed™ (Biotium) para visualización del ADN bajo luz UV.
- Se agregó la solución de agarosa al 1.5% y se dejó polimerizar. Una vez polimerizado el gel, se retiró con cuidado el peine.

Electroforesis

- Se llenó la cámara con suficiente buffer TAE 0.5X para que se cubriera el gel.
- Se conectaron los electrodos a la fuente de poder.
- Se realizó la separación de los productos de PCR junto con un marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).
- Se realizó la electroforesis a 100 V por 30 min.
- Una vez terminada, se retiró el gel de agarosa del buffer TAE.
- Se puso el gel en una cámara fotográfica bajo luz UV y se capturó la imagen en un equipo de Uvitec para verificar la amplificación del fragmento de interés (ver figura 9).

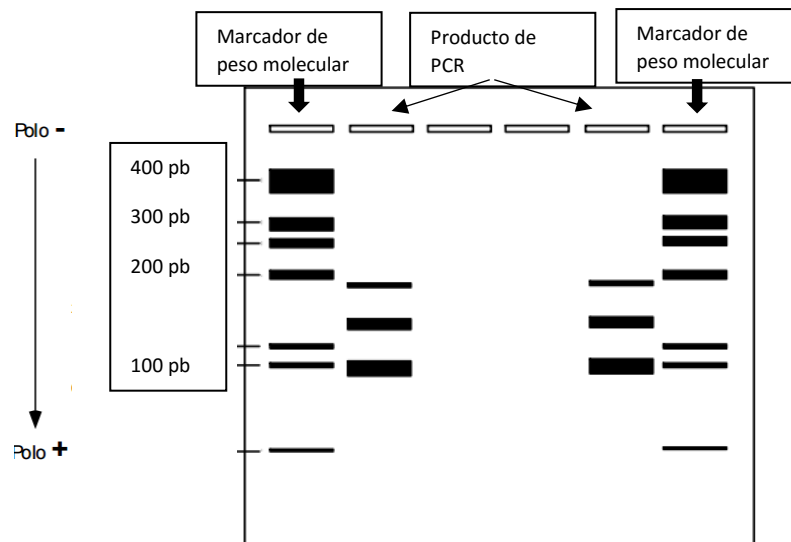


Figura 9. Representación esquemática de un gel de agarosa, corroborándose la amplificación del fragmento de interés.

Purificación de los productos de PCR con el método de columnas

- Se purificaron los productos de PCR con el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) usando al protocolo recomendado por el fabricante
- Se agregaron 85 μ l de Buffer PB y se mezcló para tener un producto homogéneo.
- Se trasladó el producto a columna.
- Se centrifugó por un minuto a 13,000 rpm.
- A cada columna se agregó 750 μ l de Buffer PE.
- Se centrifugó por un minuto a 13,000 rpm.
- Se centrifugó por una segunda ocasión en un tubo limpio.
- Posteriormente se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml.
- Se agregó 20 μ l de agua bidestilada, previamente calentada a 60°C.
- Se deja reposar durante 1 minuto.
- Se centrifugó la muestra durante 1 minuto a 13,000 rpm.
- Obteniéndose así el producto purificado de la PCR.

Secuenciación

PCR de secuencia

- Para la reacción de secuencia se utilizó el kit de Big Dye Terminator v3.0 (Applied Biosystems)
- Cada componente de la reacción de secuencia se describe en la tabla 9.

Tabla 9. Componentes de la reacción de secuencia

	1x
Agua bidestilada	4 μ l
Buffer 5x BD terminator v3.0	2 μ l
Oligonucleótidos 3.2 μM	1 μ l
ADN (productos de PCR)	2 μ l
Big Dye terminator v.3	1 μ l

Total	10 μ l
--------------	------------

Se realizan 25 ciclos de PCR de secuencia. La fase de desnaturalización fue a una temperatura de 97°C por 30 segundos, la de alineamiento a 50 ° C por 15 segundos y la de extensión a 60° C por 4 minutos.

Centri-sep

Las columnas Centri-sep son usadas para una rápida y eficiente purificación de grandes moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos complejos), así como para moléculas pequeñas como nucleótidos, buffer, sales, etc. En nuestro caso, fueron utilizadas para la purificación de los productos de PCR de secuencia de los exones 8, 11, 15, 33/34, 37 y 44 del gen *COL1A1*. El procedimiento consistió en:

1. Hidratación de la columna

- Se golpeó suavemente la columna para que el sefadex llegara al fondo de la columna.
- Se retiró la tapa superior y adicionaron 800 μ l de agua bidestilada para reconstituir la columna
- Se tapó la columna y se hidrató el gel mediante inversión de la columna o colocándola en el vórtex por un breve instante. Dejando que solidificara el gel
- Se dejaron hidratar las columnas a temperatura ambiente por 30 minutos antes de usarlas
- Se eliminaron las burbujas de aire de la columna de gel invirtiendo y golpeando ligeramente la columna
- Después de que el gel haya solidificado y esté libre de burbujas, se retiró la tapa de la columna superior y luego la inferior
- Se drenó el exceso de líquido de la columna (por gravedad) en un tubo limpio de 2ml
- La columna se centrifugó a 2,700 rpm durante 2 minutos para eliminar el líquido intersticial, dos veces seguidas

2. Procesamiento de la muestra

- Cada muestra se transfirió directamente sobre el centro de la cama de gel en la parte superior de la columna, sin perturbar la superficie del gel
- La columna se colocó en un tubo colector limpio (1,5 ml) y se centrifugó a 2,700 rpm durante 2 min
- Las muestras se desecaron por medio de vacío sin aplicar calor, durante 60 minutos
- Una vez que las muestras están completamente secas se re suspendieron en 15 µl de formamida y se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos para la secuenciación capilar.
- Los productos de PCR de secuenciación purificados se analizaron en un equipo ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).
- Las secuencias fueron comparadas con las secuencias de referencia reportadas en Genbank para *COL1A1* (NG_007400.1)

Análisis bioinformático

- Para conocer si las variantes encontradas ya habían sido reportadas previamente se buscaron en bases de datos ya establecidas:
 - Base de datos de OI y Elhes Danlos (www.le.ac.uk/ge/collagen/)
 - Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>)
 - Human gene mutation database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)
- Con el fin de evaluar el posible efecto patogénico de las variantes encontradas en la secuencia de ADN se realizó un análisis in silico usando diferentes predictores informáticos como son
 - SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)
 - Mutation taster (<http://www.mutationtaster.org/>)
 - Poly- Phen 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

Resultados

Análisis Clínico

En el periodo comprendido de enero del 2011 a junio del 2016, se reclutaron 20 pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación, valorados por el servicio de Genética, con diagnóstico clínico y radiológico de Osteogénesis Imperfecta.

De los 20 pacientes, 14 fueron hombres (70%) y 6 mujeres (30%), con un rango de edad entre 3 y 19 años. 14 casos fueron esporádicos y 6 fueron familiares (ver figura 10).

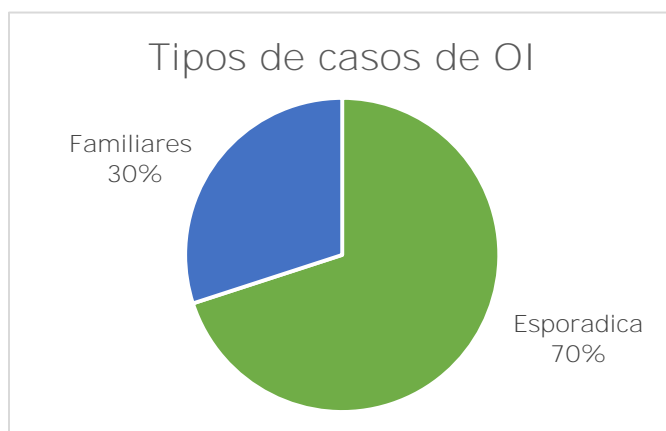


Figura 10. Gráfica que representa los tipos de casos de los pacientes con Osteogénesis Imperfecta de los pacientes estudiados.

En las figuras 11 a 13, se observan los árboles genealógicos de cuatro familias afectadas con Osteogénesis Imperfecta, distinguiéndose los principales modos de herencia.

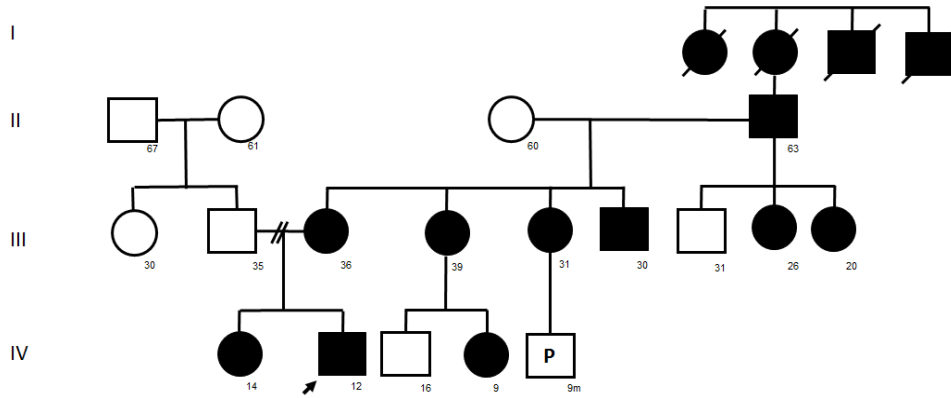


Figura 11. Árbol genealógico de la familia del paciente MVAI, donde se observa un patrón de herencia autosómico dominante.

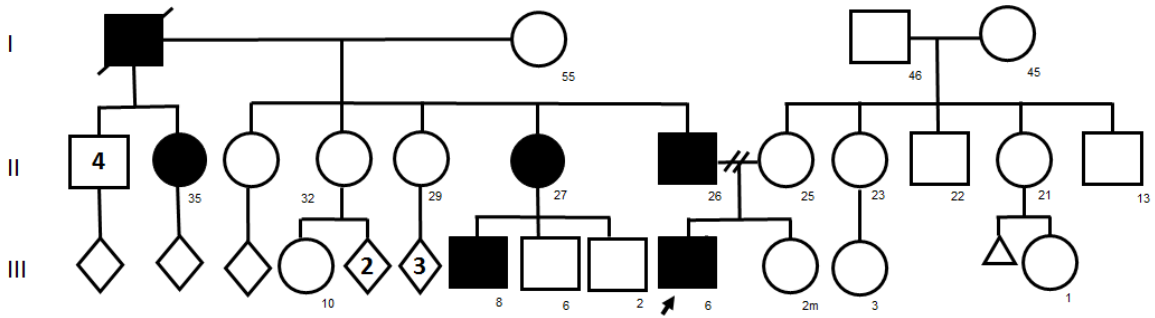


Figura 12. Árbol genealógico de la familia del paciente FPD, se observa un patrón de herencia autosómico dominante, el cual se caracteriza por una transmisión vertical

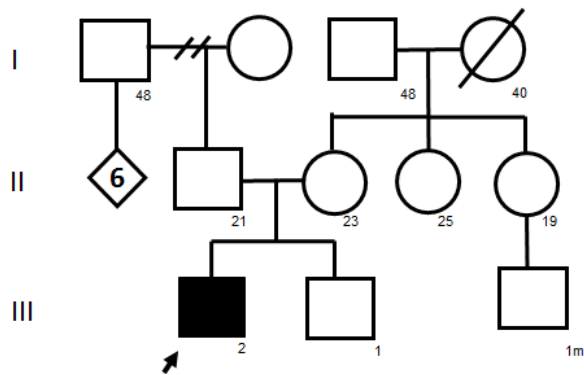


Figura 13. Árbol genealógico de la familia del paciente LGRS, donde se observa un caso esporádico sin un patrón de herencia definido.

Al ser el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) un hospital de referencia a nivel nacional, los pacientes incluidos en el estudio, provienen de diversas regiones del país, así como del extranjero, (ver figura 14).

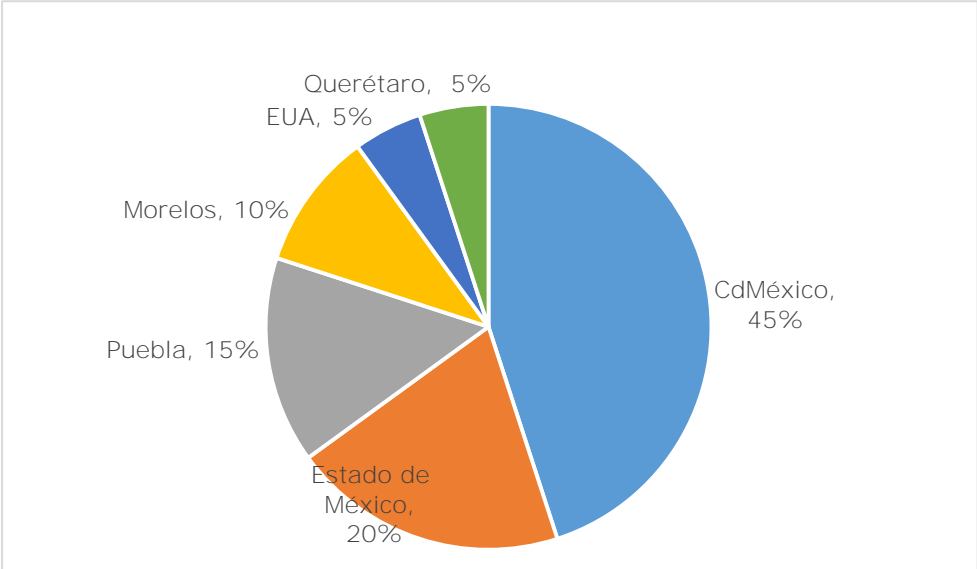


Figura 14. Lugares de origen de los pacientes incluidos en el estudio.

Con base en la clasificación de Sillence, se catalogaron a los pacientes en los 4 tipos más frecuentes de OI (ver figura 15).

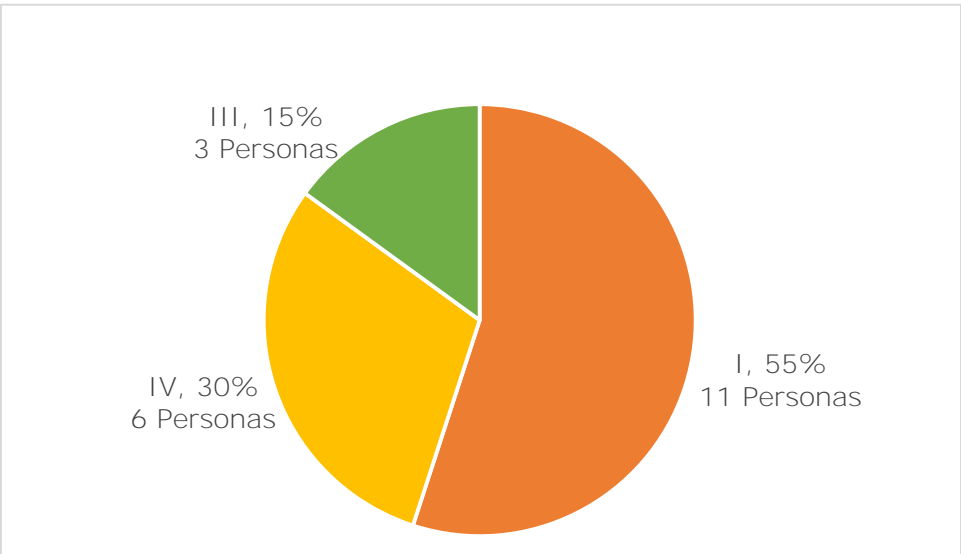


Figura 15. Clasificación de los pacientes según la clasificación de Sillence.

De acuerdo a la clasificación de Sillence, las características clínicas observadas en el presente estudio, son las indicadas en la Tabla 10.

Tabla 10. Características clínicas observadas, según la clasificación de Sillence.

Tipo	Total Px	Total Fx	T <3	Microcefalia	Marcha independiente	Marcha con apoyo	Facie triangular (ver figura 16).	Abombamiento frontal
I	11/20	2-11	0%	9%	100%	0%	18%	27%
III	3/20	9-33	66%	33%	33%	66%	0%	0%
IV	6/20	3-55	33%	0%	83%	16%	16%	16%

Tipo	Escleras Azules-grisáceas	Presencia de hematomas	Hiperlaxitud articular	Deformidades	DI	Hipoacusia	Escoliosis
I	81%	9%	36%	0%	0%	27%	27%
III	100%	0%	0%	100%	33%	33%	66%
IV	100%	50%	33%	100%	66%	0%	50%

Px: Pacientes, Fx: fracturas, T <3: talla con percentil menor a la tres, DI: Dentinogénesis Imperfecta.

Del total de pacientes reclutados, seis fueron prematuros, de ellos solo dos se encontraron por debajo del percentil tres, en su talla y peso respecto a la edad gestacional, todos los demás fueron obtenidos a término con adecuado peso para su edad gestacional

En relación al inicio, progresión y tratamiento de las fracturas, se pudo observar:

- **Tipo I forma clásica:** Se obtuvieron 11 pacientes con una edad variable, el menor de 3 años y la mayor de 19 años. Respecto al inicio de las fracturas el rango va de los 9 meses a los 6 años. El rango del número fracturas observado fue de mínimo de 2 y máximo de 11 fracturas hasta ahora, dentro de ellas solo 4 pacientes no han requerido tratamiento quirúrgico (ver tabla 10).

Dentro de su desarrollo psicomotor, un paciente presentó retraso motor secundario a las fracturas y otro mostró retraso en el lenguaje que requirió terapia de lenguaje.

Dos pacientes recibieron tratamiento con bifosfonatos durante dos años, refiriendo adecuada respuesta al tratamiento.



Figura 16. A; Paciente con diagnóstico de OI tipo III, B, paciente con diagnóstico de OI tipo I. En donde se observa la presencia de facie triangular, signo clínico referido en esta entidad.

A la exploración física se encontraron dos pacientes con escleras blancas, ocho con escleras azules y uno con escleras grisáceas.

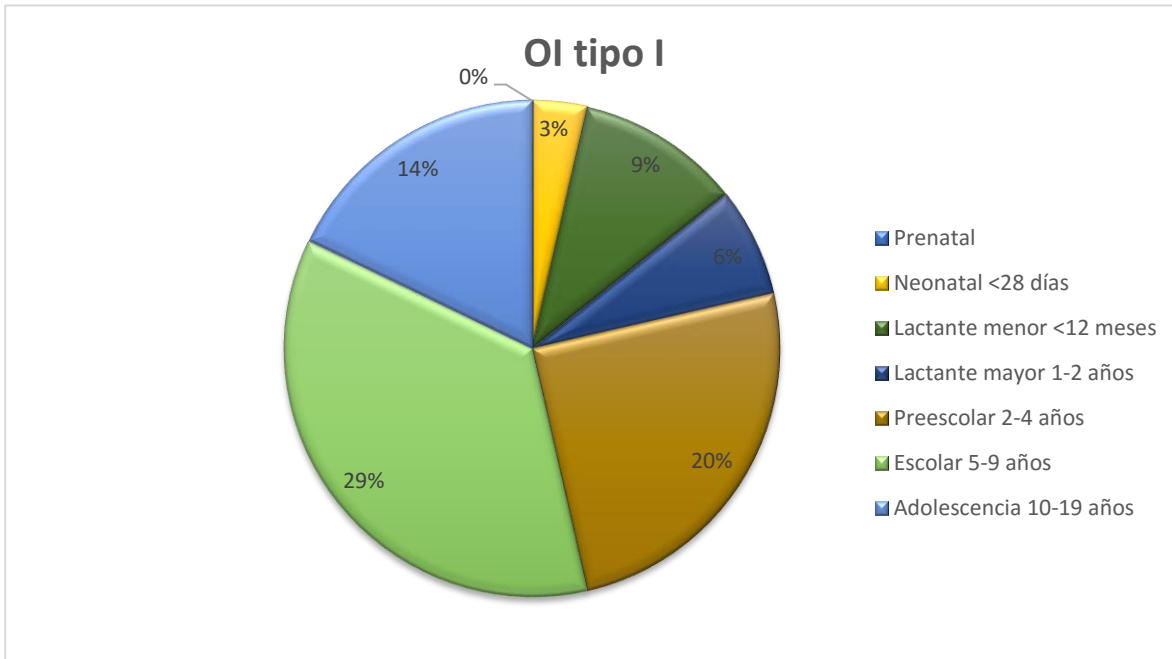


Figura 17. Relación del número de fracturas por edad, en los pacientes clasificados dentro del tipo I de OI.

- **Tipo III deformante progresiva:** Se reclutaron tres pacientes en el rango de edad de 7 a 15 años. Respecto a la edad de inicio de fracturas, ésta varió desde forma prenatal diagnosticada por ultrasonido in útero, hasta el año de edad, con un número máximo de fracturas a lo largo de la vida de hasta 33, (Figura 18), todos los pacientes han requerido por lo menos algún tratamiento quirúrgico para alguna de estas.

Como es de esperar para la clasificación, el 100% de los pacientes presentaron deformidades en los huesos de grado variable, se observó compromiso de la función respiratoria en dos de ellos con un patrón respiratorio restrictivo. El 100% presentó escleras grisáceas. Todos los pacientes fueron valorados por el servicio de audiolgía, se encontró uno con diagnóstico de hipoacusia conductiva superficial bilateral, y los dos restantes con audición normal bilateral.

Dos pacientes se encuentran en tratamiento con bifosfonatos con una duración aproximada del tratamiento de 5 años.

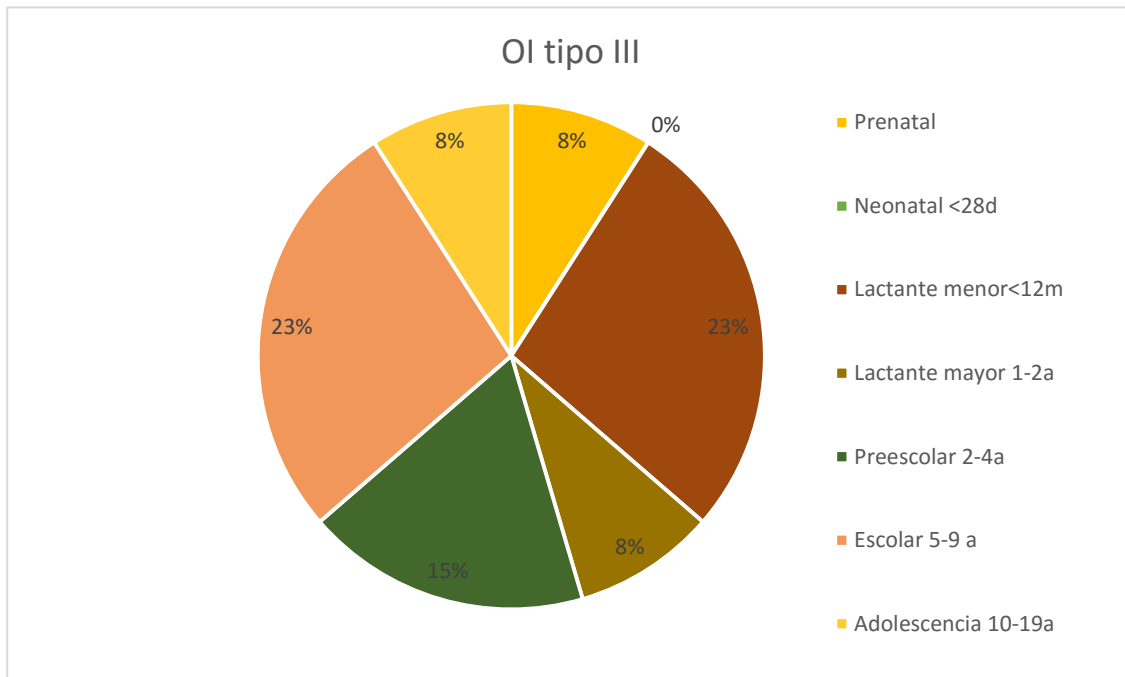


Figura 18. Relación del número de fracturas por edad, en los pacientes clasificados dentro del tipo III de OI.

- **Tipo IV moderadamente deformante:** Se clasificaron a seis pacientes de entre los 5 a 16 años de edad. En lo referente a las fracturas, estas tuvieron un inicio desde los 15 días de vida extrauterina hasta los 4 años de edad, con un total de fracturas variable, siendo el mínimo de 2 y un máximo de 55. (ver figura 19).

Dentro de su desarrollo psicomotor, uno presentó retraso en el desarrollo motor y otro retraso en el lenguaje.

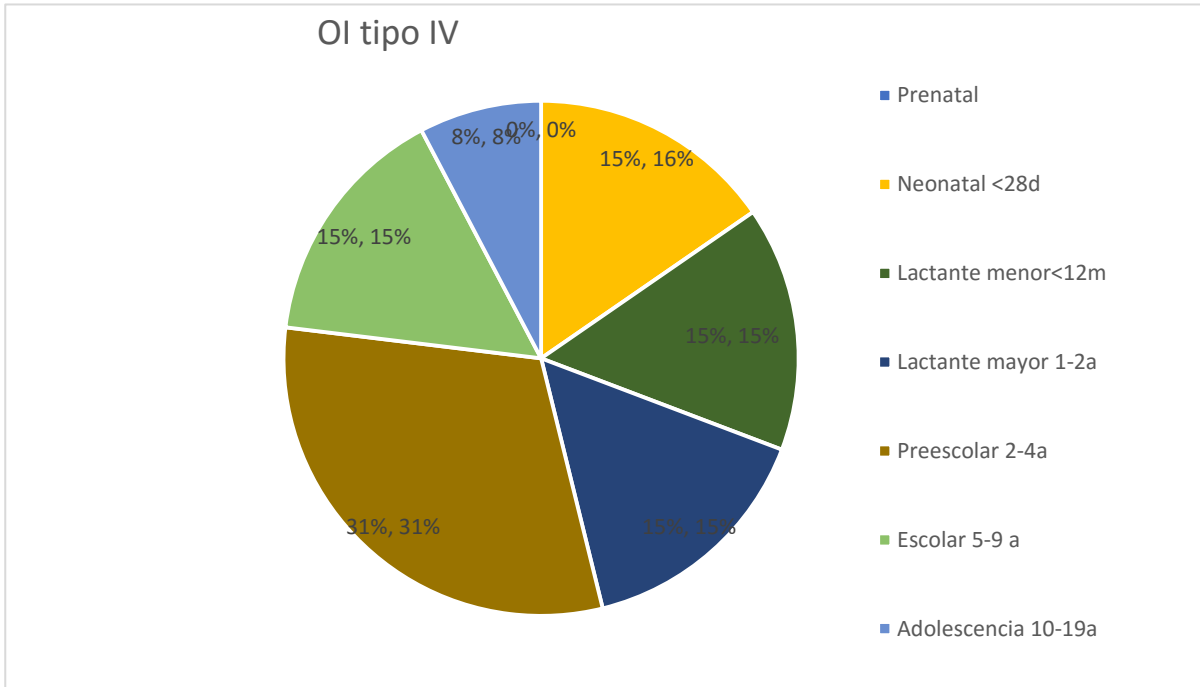


Figura 19. Relación del número de fracturas por edad, en los pacientes clasificados dentro del tipo IV de OI.

El 100% tuvo algún grado de deformidad ósea, dentro de los cuales en dos ocasionaron una falla respiratoria de predominio restrictivo. Solo un paciente ha recibido tratamiento a base de bifosfonatos durante 10 años. A la exploración física tres pacientes presentaron escleras grisáceas y tres escleras azules. (ver figura 20 y 21). Todos fueron valorados por audiología, con diagnóstico de audición normal bilateral.



Figura 20. Paciente con diagnóstico de OI tipo IV, donde se observan las características de la dentinogénesis imperfecta.

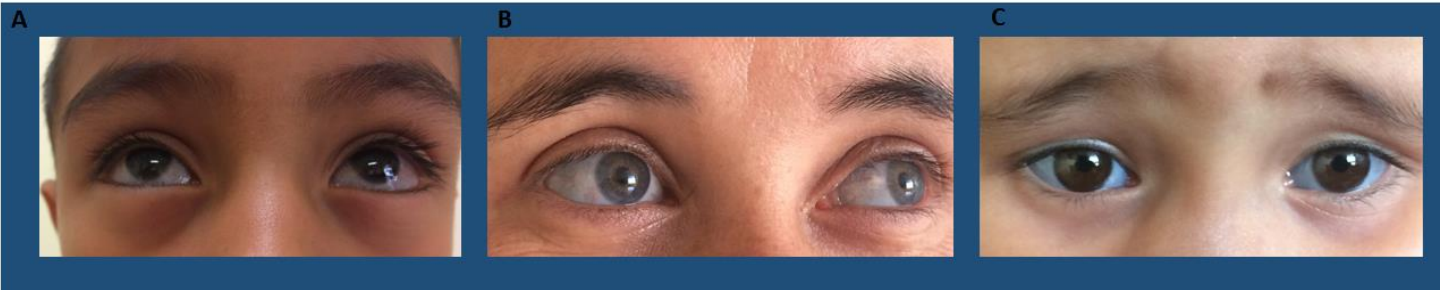


Figura 21. Pacientes con diagnóstico de OI, donde se puede observar la coloración azul-grisácea de las escleras.

Análisis Radiográfico

Se analizaron los estudios de imagen, de cada uno de los pacientes, los cuales consistieron en radiografías de cráneo, columna vertebral completa, huesos largos, húmero, radio, cúbito, fémur, tibia y peroné, todos con proyecciones AP y lateral.

En la radiografía de cráneo se observó la presencia de huesos wormianos solo en una paciente de 7 años de edad con OI tipo IV y dos pacientes presentaron suturas craneales amplias, uno con OI tipo I y otro con tipo III (ver figura 22).

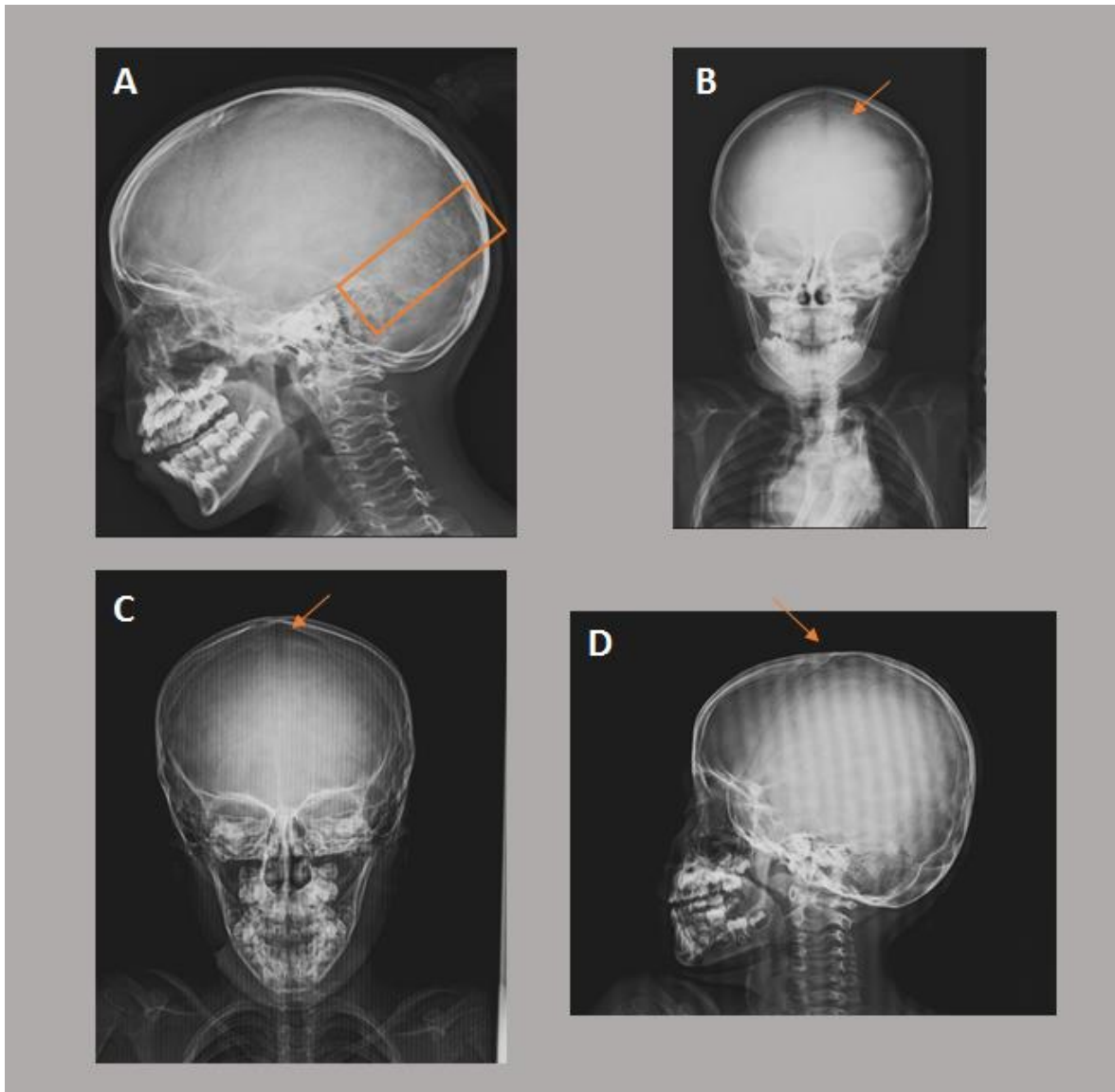


Figura 22. Radiografía de cráneo, A: Proyección lateral del paciente CNL, donde se aprecia la presencia de múltiples huesos wormianos (rectángulo). B: Rx AP de cráneo del paciente TREM donde se observa la sutura metópica abierta aún a los 3

años de edad (flecha). C y D: Rx de cráneo AP y lateral del paciente CGKD donde se observa la sutura metópica abierta, disminución de la densidad ósea y cortical adelgazada.

Dentro de las características observadas en columna vertebral, 8 pacientes presentaron escoliosis, de grado variable (ver tabla 11). En los pacientes clasificados con el tipo III, la escoliosis fue grave en severidad, ocasionando deformidad en la caja torácica y como consecuencia un patrón respiratorio restrictivo, además se observó fusión cervical de C6-C7 en otro paciente y disminución del espacio intervertebral y cuerpos vertebrales en forma trapecoidal en un paciente diferente (Ver figura 23 y 24).

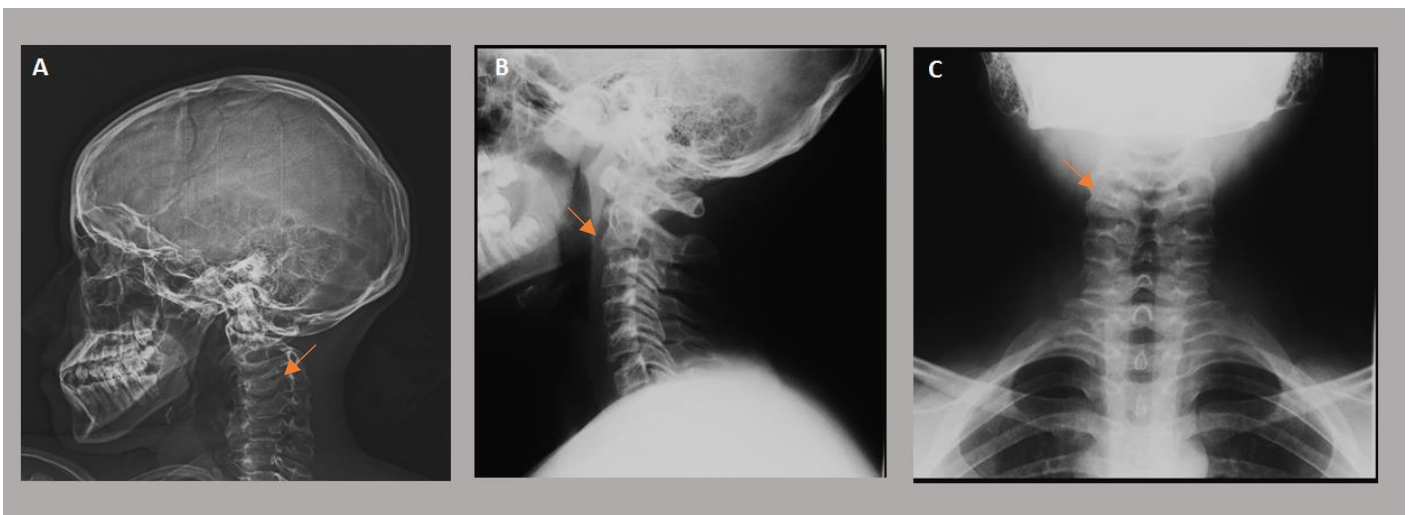


Figura 23. Radiografía de cráneo, A: Proyección lateral de vértebras cervicales donde se observa la fusión de los cuerpos vertebrales a nivel de cervical de C6-C7. B y C: se observa disminución del espacio intervertebral y los cuerpos con forma trapecoidal.

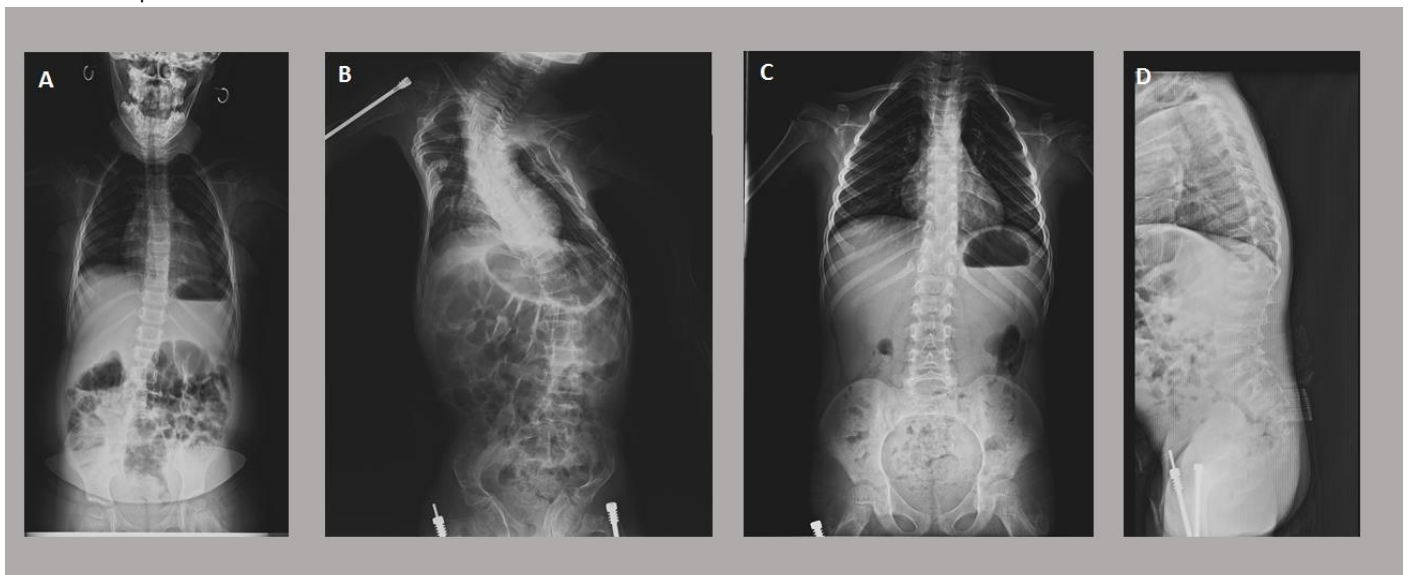


Figura 24. Radiografía de columna vertebral AP donde se observa diversos grados de escoliosis. A: paciente con OI tipo I, B: Paciente con OI tipo III, paciente con OI tipo IV.

En las radiografías de huesos largos, el 100% presentaron presentó fracturas por compresión, de predominio en las extremidades inferiores (Ver figura 25).

La Osteopenia generalizada es un rasgo que se observó en todos los pacientes en grado variable, principalmente en extremidades inferiores.

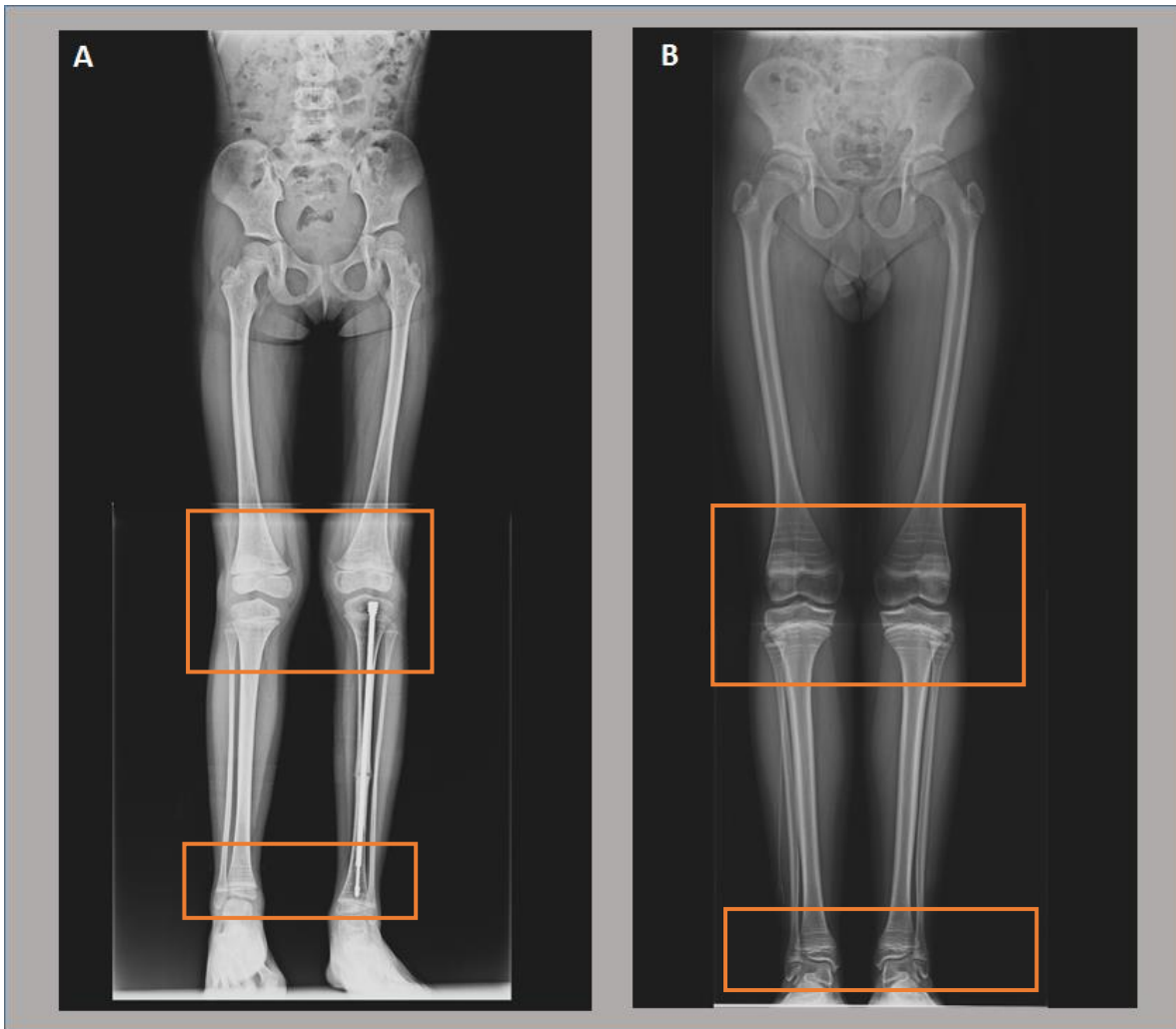


Figura 25. A y B: Eje mecánico bi-podálico donde se observan las fracturas por compresión, también denominadas líneas de zebra (rectángulos).

Todos los pacientes con el tipo III presentaron graves deformidades, principalmente de huesos largos. En dos se observó deformidad torácica de grado importante que causaron alteraciones respiratorias y requirieron uso de apoyo ventilatorio, además muchas de las fracturas consolidaron con formación de callo óseo (Ver figura 26).

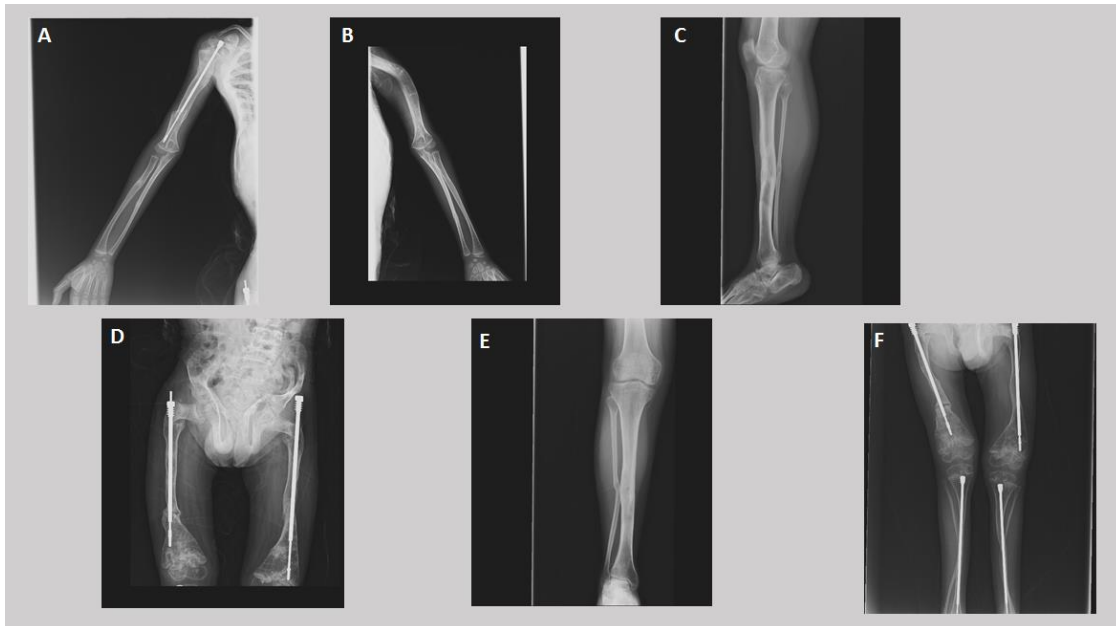


Figura 26. Se observan diversos grados de deformidad en pacientes con clase tipo III.

En los pacientes con OI tipo IV, se observó menor grado de deformidad respecto a los pacientes con el tipo III (ver figura 27).

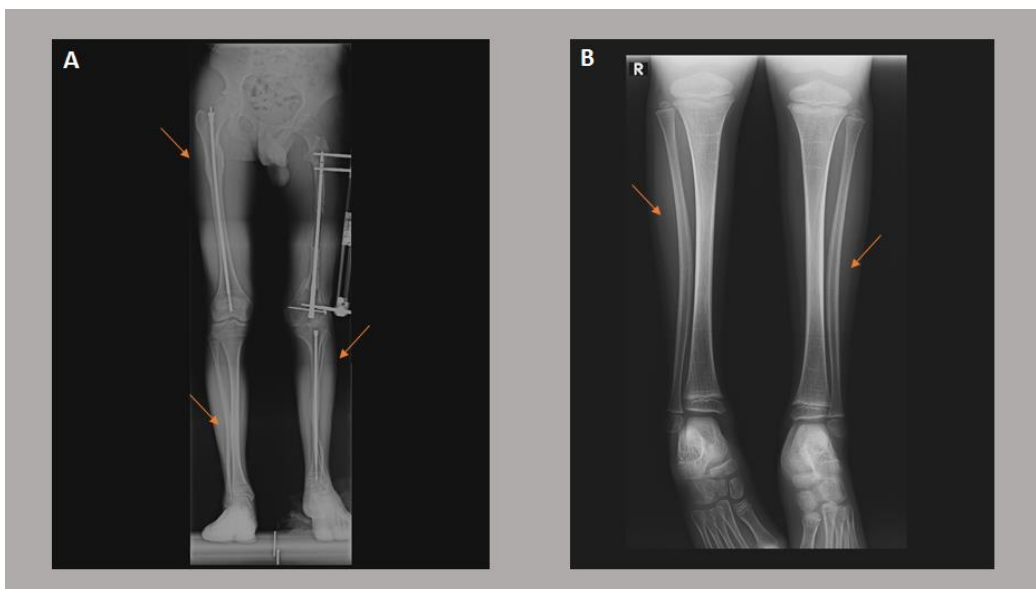


Fig. 27. Se observan deformidades en extremidades inferiores, en pacientes con diagnóstico de OI tipo IV (flechas).

Análisis de los resultados de estudio molecular

Se realizó secuenciación directa de 17 muestras de ADN que se obtuvieron del banco del laboratorio de genética, las cuales no corresponden a los pacientes analizados clínicamente, de los exones 8, 11, 15, 33/34, 37 y 44 del gen *COL1A1*.

De las muestras analizadas, seis correspondían a mujeres, siete a varones y tres a recién nacidos de los cuales se desconoce el sexo. Cinco provenían del Instituto Nacional de Pediatría, dos del Hospital Central Sur de Alta Especialidad PEMEX, dos del Instituto Nacional de Perinatología, uno del Hospital Infantil de México y siete del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Se encontraron un total de 21 posibles variantes en los exones analizados de la población en estudio (ver tabla 11), cinco correspondieron a inserciones (24%), cinco de sentido equivocado (24%), seis variantes sinónimas (28.5%), tres fueron deleciones sinónimas (14%), y dos intrónicas (9.5%). La mayoría de las variantes se encontraron en el exón 15 (ver figura 29). De las posibles variantes encontradas en el exón 15, la variante c.1107T>C, (p.G329G) se repitió en cuatro pacientes, ninguno de los pacientes tiene algún parentesco (ver figura 30). En el exón 33/34 la variante c.2417delT, (p.G767Afs*341) se repitió en tres pacientes, todos ellos no relacionados.

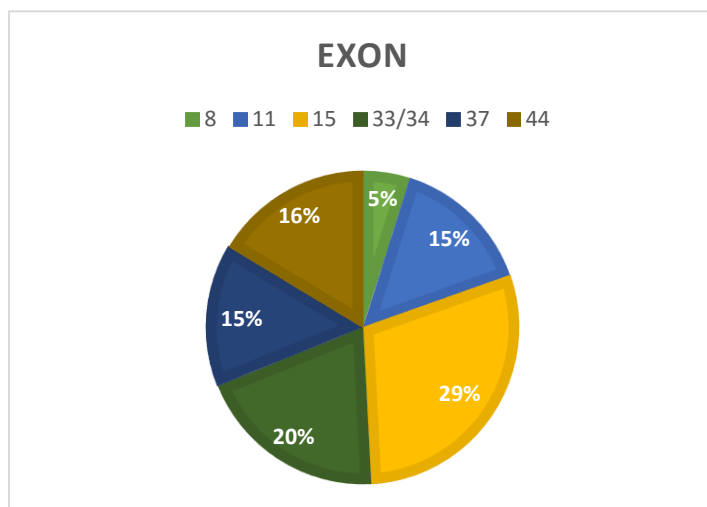


Figura 29. Distribución de las variantes por exón

Tabla 11. Variantes encontradas en la secuencia del gen *COL1A1* en la serie de pacientes con Osteogénesis Imperfecta y resultado del análisis in silico usando las bases de datos Mutation Taster, Poly-Phen2 y SIFT.

Paciente	Exón	g. DNA	c. DNA	Proteína	Tipo de variante	HGMD	EXAC	Análisis in silico	Dominio de la proteína
GTRN	8	g.8666_8667insC	c.736_737insC	p.G206Gfs*1	Inserción Sinónima, codón de paro.	No reportada	No reportada	Benigna	Triple hélice
GSS	Intrón 11	g.9631G>C;	c.804+1G>C	IVS11+1G>C	Mutación puntual	No reportada	No reportada	MT: Pb Causante de enfermedad, , cambios en el sitio de corte y empalme, probabilidad 1	Intrón
	Intrón 11	g.9646_9647insC	c.804+16insC	IVS11+16insC	Inserción	No reportada	No reportada	MT: Polimorfismo	Intrón
MLR	11	g.9577G>C	c.751G>C	p.G251R	Sentido equivocado	No reportada	No reportada	S: 0, dañino MT: afecta las características de la proteína, afecta el sitio de corte y empalme	Triple hélice

								P: 1.0, probablemente dañina	
FGI	15	g.10470 T>C	c.1107T>C	p.G329G	Mutación puntual, sinónima	No reportada	No reportada	Benigna	Triple hélice
GMI	15	g.10470 T>C	c.1107T>C	p.G329G	Mutación puntual, sinónima	No reportada	No reportada	Benigna	Triple hélice
ATG	15	g.10445C>A	c.1081C>A	p.A321D	Sentido equivocado	No reportada	No reportada	MT: Cambio en la secuencia del aminoácido, cambio en la estructura de la proteína, cambio en el sitio de corte y empalme S: tolerable, 0.12 P: 0.99 probablemente dañina	Triple hélice
SNGE	15	g.10470 T>C	c.1107T>C	p.G329G	Mutación puntual, sinónima	No reportada	No reportada	Benigna	Triple hélice

RRJU	15	g.10445_10446insG	c.1081_1082insG	p. R322Sfs*4	Inserción	No reportada	No reportada	MT: Patogénica, decaimiento del RNAm, cambio en la secuencia de aminoácidos, cambios en las características de la proteína, cambios en el sitio de corte y empalme	Triple hélice
RLM	15	g.10470 T>C	c.1107T>C	p.G329G	Mutación puntual, sinónima	No reportada	No reportada	Benigna	Triple hélice
RN/SF	33/34	g.15798G>A	c.2437G>A	p.G773D	Sentido equivocado	No reportada	No reportada	MT: Dañina, Cambios en características de la proteína P:Pb Dañina 0.99 S: Dañina 0	Triple hélice
MLR	33/34	g.15777C>T	c.2417delT	p.G767Afs*341	Delección	No reportada	No reportada	MT: Patogénica Decaimiento de RNAm.	Triple hélice
VGL	33/34	g.15777C>T	c.2417delT	p.G767Afs*341	Delección	No reportada	No reportada	MT: Patogénica	Triple hélice

								Decaimiento de RNAm.	
GTRN	33/34	g.15777C>T	c.2417delT	p.G767Afs*341	Delección	No reportada	No reportada	MT: Patogénica, decaimiento de RNAm.	Triple hélice
RN-SF	37	g.15734_15735insT	c.2574_2575insC	p. A819Cfs*2	Inserción	No reportada	No reportada	MT: Patogénica Decaimiento de RNAm, cambio en el marco de lectura	Triple hélice
		g.15741_15742insT	c.2580_2581insT	p.G821Vfs*6	Inserción	No reportada	No reportada	MT: Patogénica, decaimiento de RNAm, cambio en el marco de lectura	Triple hélice
		g.15781C>A	c.2620C>A	p.A834D	Sentido equivocado	No reportada	No reportada	P: Benigna 0.130 S: Benigna 0.56 MT: Patogénica	Triple hélice
GMI	44	g.18008_18009insT	c.3224_3225insT	p.R1036Sfs*3	Inserción	No reportada	No reportada	MT: Patogénica, decaimiento de RNAm.	Triple hélice
GMI	44	g.18094_18095insA	c.3310_3311insA	p.D1065*	Inserción	No reportada	No reportada	MT causante de enfermedad Decaimiento de RNAm	

LBC	44	g.18015G>C	c.3231G>C	p.E1038E	Sinónima		No reportado	Benigna	Triple hélice
		g.18016A>C	c.3232A>C	p.E1038A	Sentido equivocado	No reportada	No reportada	S: Tolerable 0.12. MT: Polimorfismo. Tolerable. P: 0.98 Pb dañina	Triple hélice

MT: Mutation Taster, P: Poly-Phen 2, S: SIFT, Pb: probable, HGMD: Human Gene Mutation Database, Exac:exac.broadinstitute

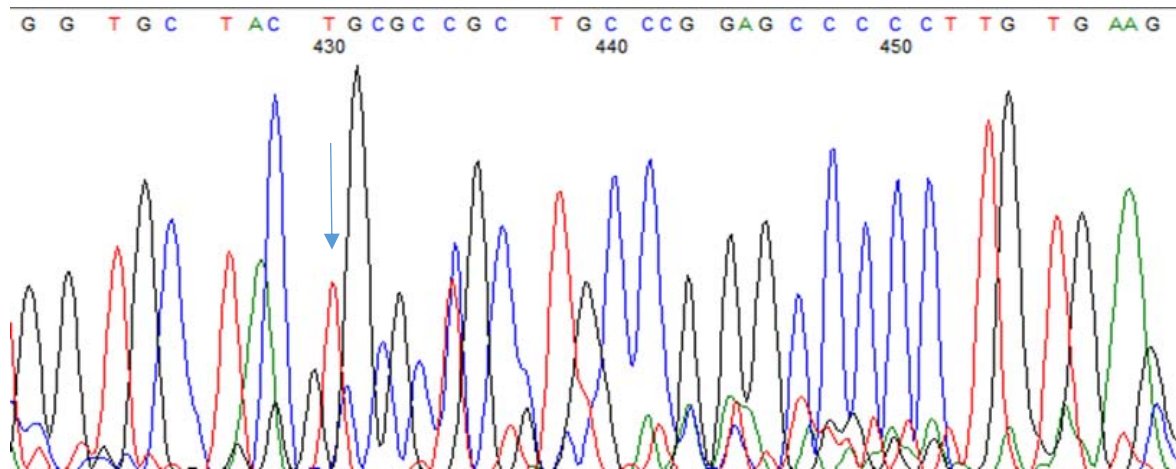


Figura 30. Electroferograma de la secuencia del exón 15 de *COL1A1* del paciente SNGE, donde se observa una mutación de sentido equivocado en estado heterocigoto, c.1107T>C, que se repite en otros 4 pacientes. Una flecha ayudaría

Ninguna de las posibles variantes observadas ha sido reportada previamente en el Human Gene Mutation Database y EXAC, todas recaen en el dominio de triple hélice de la proteína (ver figura 31).

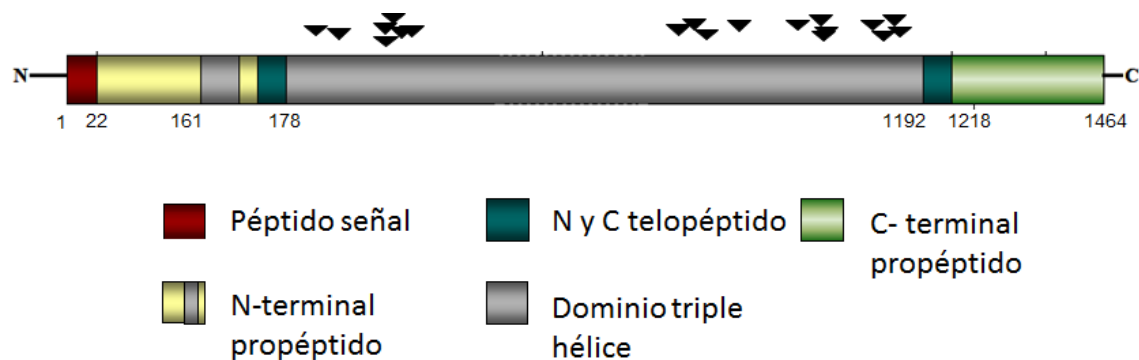


Figura 31. Representación de las posibles variantes encontradas en este estudio (cabezas de flecha negras) en los diferentes dominios de la proteína *COL1A1*. Se encontraron 38 variantes, ninguna descrita previamente, todas éstas caen en el dominio de triple hélice. Los números indican la posición de cada aminoácido dentro de la proteína.

A fin de determinar si las nuevas variantes pueden tener un efecto deletéreo en la función de la proteína, se realizó un análisis *in silico* usando un predictor bioinformático, Mutation Taster, además se ejecutó una observación de las variantes encontradas en otros dos predictores bioinformáticos, Poly-Phen 2 y SIFT.

Cada una de las herramientas utilizadas arroja la probabilidad de que los cambios puedan ser neutrales o deletéreos para la función de la proteína (ver tabla 11).

Discusión

La Osteogénesis Imperfecta es una enfermedad relativamente frecuente, se calcula que afecta a uno de cada 15,000 a 20,000 RNV. En un 90% de los casos se observa un patrón de herencia autosómico dominante. En la mayor parte de los afectados (90-95%) se logran identificar mutaciones en los genes *COL1A1* y *COL1A2*, sin embargo, también se ha observado un patrón de herencia autosómico recesivo, causado por mutaciones homocigotas en diversos genes que se han descubierto recientemente como *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *PLOD2*, *SP7*.

Los productos génicos de *COL1A1* y *COL1A2* forman la colágena tipo 1, la cual está presente en diversas estructuras del cuerpo humano, tales como dermis, hueso, tendón, dentina y córnea, por lo que las manifestaciones clínicas son principalmente a estos niveles.

El gen reportado con mayor número de variantes en pacientes con OI es *COL1A1*, las cuales pueden ocurrir a lo largo de todo el gen, sin hacerse referencia a puntos calientes. Sin embargo, se puede observar que los exones 37, 44, 11, 8, 15 y 33/34 se encuentran dentro de los más afectados, siendo la mayoría variantes de un solo nucleótido (SNV), ya sea de sentido equivocado, sin sentido y sinónimas.

En este estudio se analizaron 20 pacientes con características clínicas y radiológicas de Osteogénesis Imperfecta, con un rango de edad entre 3 y 19 años, siendo la mayoría varones (70%).

Se clasificó a los pacientes según Sillence en los tipos I al IV. La mayor parte de los pacientes pertenecían al tipo I, 11 pacientes (55%), del tipo IV se observaron seis pacientes (30%) y del tipo III tres pacientes (15%).

De acuerdo a la historia clínica y al árbol genealógico realizado, un 30% mostraron un patrón de herencia autosómico dominante, con transmisión vertical, afectando a hombres y mujeres por igual, mostrando expresividad variable intrafamiliar. La literatura reporta que aproximadamente 60% de los casos con el tipo I se presentan como casos únicos sin antecedentes familiares de la enfermedad por lo que no es posible establecer con certeza un patrón de herencia. Sin embargo para los tipos II,

III y IV cerca del 100% son casos únicos, es decir de presentación esporádica. En esta serie de pacientes se observó presentación esporádica en el 70% de los individuos estudiados, lo cual sigue lo previamente reportado.

Respecto de los pacientes con OI tipo I, el 100% presentó fracturas y se observó un rango de 2 hasta 11 fracturas a lo largo de su vida. La frecuencia clínica de las fracturas según lo reportado en la literatura es del 90-95% siendo desde unas pocas hasta más de 100 a lo largo de la vida, sin embargo estas consolidan sin presencia de deformidad.

Ninguno de los pacientes con tipo I presentó talla baja, lo cual es esperado. Se han descrito algunos pacientes con talla baja, pero que no cumplen los criterios para deficiencia de crecimiento, aunque se sabe tendrán talla más baja respecto a los miembros de su familia. Todos los pacientes refieren ser independientes y autosuficientes.

El 81% presentó alguna coloración azul-grisácea en las escleras, se conoce que la penetrancia para la coloración azul de las escleras es cerca del 100%, puede ser un fenómeno considerado normal en menores de un año, no se asocia a ninguna patología ocular y la etiología aún es incierta.

La hiperlaxitud articular se observó en el 36%, lo cual es una característica común que se presenta hasta en el 50% de los pacientes con OI tipo I. Se sabe que la hiperlaxitud aumenta el riesgo de degeneración articular y puede ser un factor predisponente para el desarrollo de escoliosis y dolor en columna vertebral.

La presencia de escoliosis se observó en un 27%, según lo descrito en estos pacientes la escoliosis se refiere idiopática. Un 9% presentó hematomas al momento de la exploración física, lo cual es un hallazgo frecuente en este tipo de OI. En la exploración de cabeza se encontró facie triangular en un 18% y un 27% con abombamiento frontal.

En un 27% se corroboró hipoacusia, lo cual se reporta como un hallazgo frecuente en la literatura. La hipoacusia es inicialmente conductiva debido a fracturas en los huesecillos del oído medio, y evoluciona a neurosensorial, según lo descrito en la literatura se presenta en el 50% de los casos a la edad de los 40 años. Cabe señalar

la presencia de un paciente con microcefalia, signo clínico no reportado previamente.

Para los pacientes del tipo III, se observó un rango total de número de fracturas de 9 hasta 33. Se ha reportado la presencia de hasta 200 fracturas a lo largo de la vida y deformidad ósea progresiva aún en ausencia de fracturas.

La deformidad ósea puede alcanzar ángulos de hasta 70-90° en los huesos largos. Los factores que influyen en esta angulación son la fuerza mecánica ejercida por el músculo y tendón así como fracturas previas con formación de callo óseo, lo cual se observó en estos pacientes. Uno de los pacientes presentó fracturas de forma prenatal. Este hallazgo no es usual ya que la literatura reporta que el inicio de las fracturas en la mayoría se da en el periodo neonatal.

Un 66% de los afectados en este grupo requiere apoyo para la marcha. Según lo reportado, la mayoría de los individuos afectados requieren asistencia para la marcha con uso de silla de ruedas. La fragilidad ósea y la marcada deformidad los lleva a requerir mayor asistencia para las actividades de la vida diaria.

El 66% de los pacientes estudiados presentaron talla baja. Este tipo de OI se caracteriza por disminución en la velocidad de crecimiento. Los pacientes nacen con peso y talla de acuerdo a su edad gestacional, que disminuye conforme crecen debido a deformidad en extremidades superiores e inferiores. En los adultos la talla baja está en el 100%, algunos incluso con talla menor a los 100 cm.

El 100% de los afectados presentó escleras azul-grisáceas. En estos pacientes también se ha reportado una coloración blanca de las escleras, lo cual no se observó en el presente estudio. Un 33% presentó dentinogénesis imperfecta, siendo reportada como una característica variable.

La hipoacusia se observó en un 33%, la cual es común en este tipo de OI siendo más frecuente en adultos y usualmente progresiva. En un 66% se presentó escoliosis, la literatura describe que se presenta una cifo escoliosis progresiva de inicio en la infancia., La cifo escoliosis contribuye a la enfermedad pulmonar restrictiva, lo que incrementa el riesgo de desarrollar neumonías de repetición que pueden desencadenar core pulmonar.

Los pacientes catalogados como tipo IV presentaron un fenotipo muy variable. El grado de deformidad fue menos severa respecto al tipo III. Para distinguir la forma leve del tipo III de OI y el tipo IV se hace referencia a la independencia ambulatoria, la cual es más característica del tipo IV y en este estudio se observó en un 83%.

En estos pacientes se presentó un número total de fracturas de hasta 55 a lo largo de su vida. Se sabe el número disminuye después de la pubertad e incrementan posterior a la menopausia, sin embargo es muy variable. El 100% presentó coloración gris-azul en las escleras, aunque de forma clásica se describe este tipo con escleras blancas. Hasta en el 10% de los casos se puede presentar una coloración azul-grisáceo.

El 33% presentó talla baja, se reporta que la talla final se encuentra por debajo del percentil 5. La hiperlaxitud articular se reporta como un rasgo variable, estando presente en el 33% de los pacientes. La hipoacusia en la literatura se reporta hasta en 42% de los pacientes, en este estudio no se observó en ningún paciente. La dentinogénesis imperfecta se reporta como una característica variable, en este grupo de pacientes se presentó en el 66%.

El análisis radiológico corroboró diversas características reportadas en la literatura como frecuentes para OI, tales como la disminución de la densidad mineral ósea y el adelgazamiento de la cortical generalizado, estas dos características estuvieron presentes en el 100% de los pacientes estudiados lo cual concuerda con lo reportado.

Como lo esperado en pacientes con el tipo I, no se observaron fracturas en costillas. Los pacientes presentaban adecuado remodelamiento óseo sin fracturas congénitas u osteopenia. En un paciente se observó fusión cervical a nivel de C6-C7. Esto puede ser una característica adicional del paciente, ya que dentro de las características radiológicas no se ha reportado.

Dentro de las características radiológicas en los pacientes con OI tipo III, la deformidad en los huesos tubulares, la osteopenia generalizada y múltiples fracturas con formación de callo óseo se encontraron en el 100%. Además, se corroboró la escoliosis con compresión de cuerpos vertebrales y deformidad

secundaria de la caja torácica en el 66%. Debido al retardo en la osificación se observaron suturas craneales amplias en un 33% de los pacientes.

En los pacientes con OI tipo IV, en uno se observó la presencia de huesos wormianos, signo radiológico que puede estar presente también en la OI tipo I y III. Además, en la literatura se reporta angulación progresiva de los huesos largos en algunos pacientes dato que no puede ser valorado en estos pacientes ya que no se les dio un seguimiento a través del tiempo de evolución.

En los tipos I, III y IV se reporta la presencia de fracturas por compresión, principalmente en huesos largos hasta en el 100% de los pacientes, dato también presente en todos los pacientes estudiados.

De las muestras obtenidas del banco de DNA del laboratorio, se analizaron las secuencias de los exones 8, 11, 15, 33/34, 37 y 44 del gen *COL1A1*, incluyendo las respectivas uniones exón/intrón. Se encontraron 21 posibles variantes en la secuencia de ADN genómico, de los cuales la mayoría corresponden a variantes de un solo nucleótido (52%), lo cual concuerda con lo reportado en las bases de datos de Osteogenesis Imperfecta, que resultan en cambios de sentido equivocado, sin sentido y sinónimas.

Ninguna de estas variantes se ha reportado previamente en las bases Human Gene Mutation Database y EXAC. Se realizó un análisis *in silico* usando tres predictores bioinformáticos (Mutation Taster, Poly-Phen2 y SIFT) para conocer el posible efecto de las variantes en la función de la proteína. Los resultados indican que 13 (62%) son potencialmente dañinos y probablemente causantes de enfermedad, ocho variantes (38%) son reportadas como benignas, es decir que no parecen afectar la función de la proteína. Es importante mencionar que todas estas variantes deben ser confirmadas con nuevos productos de PCR y secuenciando las dos cadenas (sentido y antisentido). En caso de confirmarse, se deben buscar en 100 cromosomas de individuos clínicamente sanos de la población en general para descartar que se trate de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Posteriormente los estudios funcionales ya sea en cultivo celular o modelos animales indicarán si existe una alteración a nivel proteico que pueda ser causante de enfermedad.

En México se estima que hay más de 5,000 personas afectadas con OI, respecto a esto no hay alguna bibliografía que reporte las características clínicas, radiológicas y moleculares en pacientes mexicanos.

En resumen, este estudio presenta el análisis clínico, radiológico y molecular de un grupo de pacientes con datos clínicos y radiológicos de Osteogénesis Imperfecta. La frecuencia de los diferentes tipos de la clasificación de Sillence, se presentó de acuerdo a lo reportado en la literatura. El tipo I fue el más frecuente, seguido del IV y finalmente el III. Así mismo se corroboraron las características clínicas más frecuentes dentro de los tres tipos observados. No se encontró ningún paciente con el tipo II, probablemente debido a su alta mortalidad en el primer mes de vida y a que en el Instituto Nacional de Rehabilitación no se revisan neonatos. El gen *COL1A1* cuenta con 52 exones por lo que en este estudio se trataron de explorar los exones con mayor frecuencia de mutaciones, según las bases de datos de esta entidad. Se encontraron 21 posibles variantes en la secuencia de *COL1A1* en 12 individuos estudiados (70%). De estas variables ninguna ha sido reportada previamente. Para conocer su relevancia clínica se realizó un análisis bioinformático, el cuál sugirió en unos 57% variantes potencialmente dañinas. Es necesario que estas variantes sean confirmadas con un nuevo producto de PCR. En caso de confirmarse se deben buscar en por lo menos 100 cromosomas de individuos sin datos clínicos de la enfermedad, para descartar que se traten de polimorfismos presentes en la población mexicana y puedan considerarse como variantes causantes de enfermedad.

Bibliografía

- Alanay, Y., Avaygan, H., Camacho, N., Utine, G. E., Boduroglu, K., Aktas, D., ... Krakow, D. (2010). Mutations in the Gene Encoding the RER Protein FKBP65 Cause Autosomal-Recessive Osteogenesis Imperfecta. *American Journal of Human Genetics*, *86*(4), 551–559. doi:10.1016/j.ajhg.2010.02.022
- Amor, I. M. Ben, Glorieux, F. H., & Rauch, F. (2011). Genotype-Phenotype Correlations in Autosomal Dominant Osteogenesis Imperfecta. *Journal of Osteoporosis*, *2011*. doi:10.4061/2011/540178
- Bailleul-Forestier, I., Berdal, A., Vinckier, F., de Ravel, T., Fryns, J. P., & Verloes, A. (2008). The genetic basis of inherited anomalies of the teeth. Part 2: Syndromes with significant dental involvement. *European Journal of Medical Genetics*, *51*(5), 383–408. doi:10.1016/j.ejmg.2008.05.003
- Baljet, B. (2002). Aspects of the history of osteogenesis imperfecta (Vrolik's syndrome). *Annals of Anatomy*, *184*(1), 1–7. doi:10.1016/S0940-9602(02)80023-1
- Bonafe, L., Cormier-Daire, V., Hall, C., Lachman, R., Mortier, G., Mundlos, S., ... Unger, S. (2015). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *167*(12), 2869–2892. doi:10.1002/ajmg.a.37365
- Byers, P. H., & Pyott, S. M. (2012). Recessively inherited forms of osteogenesis imperfecta. *Annual Review of Genetics*, *46*, 475–97. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155608
- Caparro, A., Valencia, M., Lapunzina, P., Aglan, M., Temtamy, S., Martı, V., ... Ruiz-perez, V. L. (2010). Identification of a Frameshift Mutation in Osterix in a Patient with Recessive Osteogenesis Imperfecta, 110–114. doi:10.1016/j.ajhg.2010.05.016
- Christiansen, H. E., Schwarze, U., Pyott, S. M., AISwaid, A., Al Balwi, M., Alrasheed, S., ... Byers, P. H. (2010). Homozygosity for a Missense Mutation in SERPINH1, which Encodes the Collagen Chaperone Protein HSP47, Results in Severe Recessive Osteogenesis Imperfecta. *American Journal of Human Genetics*, *86*(3), 389–398. doi:10.1016/j.ajhg.2010.01.034

- Dalgleish, R. (1997). The human type I collagen mutation database, *25*(1), 181–187.
- Evereklioglu, C., Madenci, E., Bayazit, Y. A., & Bekir, N. A. (2002). Central corneal thickness is lower in osteogenesis imperfecta and negatively correlates with the presence of blue sclera, (May), 511–515.
- Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, J. C. (2011). New Perspectives on Osteogenesis Imperfecta. *Nat. Rev. Endocrinol.*, *7*(9), 540–557. doi:10.1038/nrendo.2011.81.New
- Forlino, A., Cabral, W. a, Barnes, A. M., & Marini, J. C. (2011). New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nature Reviews. Endocrinology*, *7*(9), 540–557. doi:10.1038/nrendo.2011.81
- Forlino, A., & Marini, J. C. (2015). Osteogenesis imperfecta. *Lancet*, *363*(9418), 1–15. doi:10.1136/bmj.2.2392.1243-c
- Hald, J. D., Folkestad, L., Harsløf, T., Lund, A. M., Duno, M., Jensen, J. B., ... Langdahl, B. (2016). Skeletal phenotypes in adult patients with osteogenesis imperfecta—correlations with COL1A1/COL1A2 genotype and collagen structure. *Osteoporosis International*, *1*. doi:10.1007/s00198-016-3653-0
- Harrington, J., Sochett, E., & Howard, A. (2014). Update on the Evaluation and Treatment of Osteogenesis Imperfecta. *Pediatric Clinics of North America*, *61*, 1243–1257. doi:10.1016/j.pcl.2014.08.010
- Körkkö, J., Ala-Kokko, L., De Paepe, A., Nuytinck, L., Earley, J., & Prockop, D. J. (1998). 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 . *The American Journal of Human Genetics*, *62*(1), 98–110. doi:10.1086/301689
- Morello, R., Bertin, T. K., Chen, Y., Hicks, J., Tonachini, L., Monticone, M., ... Lee, B. (2006). CRTAP Is Required for Prolyl 3- Hydroxylation and Mutations Cause Recessive Osteogenesis Imperfecta. *Cell*, *127*(2), 291–304. doi:10.1016/j.cell.2006.08.039
- Rohrbach, M., & Giunta, C. (2012). Recessive osteogenesis imperfecta: Clinical, radiological, and molecular findings. *American Journal of Medical Genetics, Part*

- C: *Seminars in Medical Genetics*, 160 C(3), 175–189.
doi:10.1002/ajmg.c.31334
- Sarathchandra, P., Pope, F. M., & Ali, S. Y. (1999). Orthopedic Surgical Forums Morphometric Analysis of Type I Collagen Fibrils in the Osteoid of Osteogenesis Imperfecta. *Calcified Tissue International*, 65, 390–395.
- Sathasivam, S. (2011). Current and emerging treatments for the management of myasthenia gravis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 7, 313–323.
doi:10.2147/TCRM.S14015
- Sillence, D. O., Senn, A., & Danks, D. M. (1979). Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *Journal of Medical Genetics*, 16(2), 101–16.
doi:10.1136/jmg.16.2.101
- Sykes, Bryan Ph D. Martin J.O Francis, D.Phil. Roger Smith, M. D. (1977). The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at DUKE MEDICAL CENTER LIBRARY on November 15, 2015. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society. All rights re. *The New England Journal of Medicine*, 1200–1202.
- Van Dijk, F. S., Cobben, J. M., Kariminejad, A., Maugeri, A., Nikkels, P. G. J., Van Rijn, R. R., & Pals, G. (2011). Osteogenesis imperfecta: A review with clinical examples. *Molecular Syndromology*, 2(1), 1–20. doi:10.1159/000332228
- Van Dijk, F. S., & Sillence, D. O. (2014). Osteogenesis imperfecta: Clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 164(6), 1470–1481. doi:10.1002/ajmg.a.36545
- Zack, P., Zack, L. R., Surtees, R., & Neville, B. G. R. (2007). A standardized tool to measure and describe scleral colour in osteogenesis imperfecta, 174–178.
doi:10.1111/j.1475-1313.2006.00467.x

www.le.ac.uk/ge/collagen/

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

<http://sift.jcvi.org/>

<http://exac.broadinstitute.org/>

<http://www.mutationtaster.org/>

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>