

**14° INFORME ANUAL
DEL PROYECTO DE INVESTIGACION
COLABORATIVO EN FIBRODISPLASIA OSIFICANTE
PROGRESIVA (FOP)**

ABRIL 2005

**FREDERICK S. KAPLAN, M.D.
DAVID L. GLASER, M.D.
ROBERT J. PIGNOLO, M.D., PH.D.
EILEEN M. SHORE, PH.D.**

Mientras escalaba montañas en Alaska algunos años atrás, uno de nosotros trepó sobre una saliente en la montaña desde la cual se podían ver sus más altos picos, o al menos eso parecía. Sólo escalando más alto era posible notar que la cima observada era solo uno de los muchos picos bajos que ocultaban la real cima profundamente envuelta entre las nubes. Esto también es lo que ocurre con la investigación en FOP. Lo que inicialmente parecía una alta montaña, es actualmente uno de los muchos picos pequeños de una cadena montañosa de altura insondable.

Algún día un niño con FOP nacerá y todo lo relacionado con su desalentadora cadena montañosa de FOP será conocido, la base genética, el origen molecular, la naturaleza de sus senderos, la identidad de sus respectivas células y los blancos corriente abajo, las drogas para prevenirla y las terapias para curarla. Ese día no está disponible aún, pero el viaje y la subida a la cima real continúa realizándose de manera dificultosa e ininterrumpida.

Nuestro viaje a través de los años nos ha dado una gran perspectiva, y hemos aprendido mucho sobre esta cadena montañosa denominada FOP. Tenemos una buena base desde la cual los instrumentos científicos y un buen sentido del montañismo nos dicen donde ir, pero debemos ser humildes, vigilantes y estar alertas. A pesar de una creciente dependencia de pistas en los niveles celular y molecular, no podemos ignorar la perspectiva que hemos logrado en nuestro ascenso. Si hay un tema de relevancia en el informe de este año, es que “ninguna pista es demasiado pequeña para ser ignorada, tampoco la sombra de las nubes, ni el sonido del viento, ni aún el susurro de un compañero de viaje de FOP, o un pequeño ratón”.

El Informe Anual de este año podría estar titulado, “De ratones y de hombres” (aunque no se trata de la novela del escritor John Steinbeck), pero tanto en el menos de ficción informe de los científicos y médicos trabajando en FOP, así como también los dos descubrimientos seminales en la investigación en FOP durante 2004, ocurrieron en ambas partes de la clínica, uno en un ratón y otro en un hombre. Uno de los descubrimientos mencionados vino del único paciente con FOP que recibió un transplante de médula ósea por una condición no relacionada con FOP. El seguimiento a largo plazo de este paciente, nos informó más de FOP en una hora de revisión clínica que lo que posiblemente podrían haber revelado un cuarto de siglo de experimentos. El segundo descubrimiento mencionado, ocurrió en el otro lado de la clínica, en un pequeño ratón

transgénico, desarrollado por neurocientíficos que estaban estudiando el rol de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) en el desarrollo del cerebro. El ratón transgénico, modificado por ingeniería para sobre producir BMP4 en su sistema nervioso, sorprendentemente desarrolló osificación heterotópica. Pero lo más interesante de todo, fue que la formación ósea fue progresiva y siguió un patrón, diferente del visto en pacientes con FOP, pero un patrón al fin.

Sir William Osler, uno de los más famosos médicos del siglo XIX, dijo, “La clínica es un laboratorio, y del más alto orden”. Mientras que en el pasado año hubo descubrimientos importantes realizados en los niveles celular y molecular, nuestros más reveladores discernimientos, provinieron de la clínica, tanto de pacientes como de ratones, de lo cual se conocerá más en este informe y en próximos.

El Informe Anual, es nuestra posibilidad de comunicarles lo que estuvimos realizando en todo el año, lo que descubrimos accidentalmente y en otros casos de manera planeada, lo que estuvimos pensando, los experimentos que realizamos, los que funcionaron y los que no, los desvíos que tomamos, las “minas de oro” que encontramos, y aquellos callejones sin salida en los que nos metimos, lo que esperamos encontrar, y aquello que encontramos sin que nadie pudiera anticiparlo previamente, dado que nadie había estado antes en ese campo. También seguiremos comunicándole lo que solíamos pensar y aquello que los nuevos datos nos impulsan a pensar en la actualidad, lo que realizamos el pasado año y lo que planeamos realizar en el siguiente año.

Para poder mantener este informe actualizado, informativo e introspectivo y de un tamaño y magnitud que pueda ser fácilmente traducible en siete o más idiomas en un lapso adecuado, estamos tratando de escribirlo en una versión más corta. Contendrá tanta información como antes, pero esta será compactada como un tipo de “*Titulares de Noticias sobre FOP*”. Siempre estamos tratando de pensar nuevas maneras de informarlos, en la *Guía para Pacientes FOP y Familias*, en la actualizada versión de *La Guía de Tratamientos de FOP*, en la *Conexión FOP*, y en los boletines que de tiempo en tiempo publicamos en el sitio web. Como un científico dijo, “*El mejoramiento de los tratamientos médicos, depende de un camino continuo de creación de conocimiento, de su diseminación y su aplicación*”

Los aspectos más destacados en la investigación en FOP durante el año 2004, incluyen los siguientes descubrimientos y conocimientos:

1. La evaluación de un paciente con FOP que recibió un trasplante de médula ósea, por una condición no relacionada con FOP varios años atrás, que revela que el sistema inmune es un sensible disparador, pero no un disparador específico para los brotes de FOP.
2. Ratones transgénicos producidos por ingeniería para sobreexpresar BMP4 en el sistema nervioso, desarrollaron osificación heterotópica progresiva. No obstante, existen grandes diferencias en la tasa de osificación heterotópica progresiva aún entre ratones genéticamente similares. (Estos ratones, descubiertos por el Dr. Lixin Kan de la Northwestern University, fueron afectivamente llamados “Los Ratones FOPPY” por la miembro de IFOPA, Louise Wedderburn de Rosehearty, Escocia).
3. El estímulo para la osificación heterotópica en pacientes con FOP puede estar no simplemente relacionado con el incremento en la entrega de BMP4 a los tejidos, como en el ratón FOPPY, pero más probablemente la sobreactividad de la vía BMP4 sea debido a la desregulación de la señalización del receptor de BMP4 y su transporte a través de la membrana celular.
4. Se descubrió un “velocímetro molecular” para la medición de la actividad en la senda de BMP4 en células FOP y control.
5. A pesar de que se realiza una entrega general de BMP4 a la mayoría de los tejidos del cuerpo, sólo una pequeña cantidad de tipos de células parecen ser sensibles al incremento crónico de la actividad de la vía de señalización de BMP4.
6. Hemos agregado una nueva familia multigeneracional al análisis de ligamiento genético, llegando a un total de 11 familias multigeneracionales en el mundo, de estas, 4 son centrales y 7 de apoyo. Utilizando los datos de esta nueva familia, hemos reducido el intervalo de ligamiento en los cromosomas, para el gen que causa FOP.
7. Células adherentes de la sangre periférica de pacientes FOP, formaron hueso *in vivo* y son derivadas de la médula ósea.

- 8 Promotores inductibles (interruptores moleculares) fueron desarrollados para el uso en estudios pre-clínicos en la terapia génica con noggin para el tratamiento de FOP.

Adicionalmente a estos proyectos pilotos y continuando con los estudios de largo plazo, los esfuerzos de investigación para el 2005 incluyen:

1. Estudios de los mecanismos de osificación heterotópica en los ratones FOPPY
2. Utilización de los ratones FOPPY para determinar la eficacia de drogas disponibles en la lentificación de la progresión de la osificación heterotópica.
3. Estudios de la participación del sistema inmune como disparador de los brotes de FOP.
4. Caracterización molecular de las anomalías de los receptores de tráfico y señalización de BMP4 en las células FOP, para lograr la identificación del defecto subyacente molecular en FOP.
5. Exploración de abordajes de los inhibidores de transducción de la señal para bloquear la señalización en las células FOP.
6. Mapeo de alta resolución del locus del gen que causa FOP utilizando los datos del método de amplio ligamiento génico y la localización del gen candidato de familias multigeneracionales.
7. Caracterización avanzada de las células adherentes derivadas de la sangre y su rol en la osificación heterotópica.
8. Estudios pre-clínicos para el avance en la terapia génica con noggin utilizando promotores inductibles.

Mientras que la misión de la investigación en FOP es clara, los proyectos de investigación y los descubrimientos no son fines en sí mismos, sino postas a lo largo de una difícil subida que finalmente terminará con la cura de FOP.

El Informe Anual de este año será dividido en nueve secciones principales que organizan más claramente y destacan la vasta cantidad de trabajo y actividades de los laboratorios FOP central y colaborativos. Estas secciones son:

- I. Genes
- II. Vías
- III. Células
- IV. Modelos
- V. Disparadores
- VI. Tratamientos
- VII. Presentaciones, encuentros, informes y publicaciones
- VIII. Su laboratorio FOP
- IX. Agradecimientos

Esperamos que al informe de este año lo encuentren interesante, comprometedor, y útil. Esta es la actitud con la cual abordamos nuestro trabajo cada día. Ustedes han estado con nosotros en cada etapa de este viaje, y queremos compartir con ustedes lo que encontramos, lo que hemos visto, y lo que hemos aprendido. Finalmente, ustedes los pacientes, serán los beneficiarios de este trabajo.

I. GENES

La identificación del gen que cuando muta, causa FOP será una llave para entender FOP así como muchas condiciones más comunes de desarrollo esquelético. Las mutaciones responsables de la mayoría de las condiciones genéticas son identificadas a través de rastrear los patrones de herencia de piezas de DNA (llamados marcadores) a través de largas familias multigeneracionales.

Análisis amplio de ligamiento genético

Varios años atrás, enfatizamos la importancia del análisis amplio de ligamiento genético en la localización e identificación del gen de FOP. Una explicación detallada de los principios de este análisis se pueden encontrar en el 13° Informe Anual en: www.ifopa.org/español

Brevemente, un análisis amplio de ligamiento genético es una herramienta científica que nos permite correlacionar las características clínicas de una condición (como FOP), con la distinción molecular y marcadores genéticos que son coheredados con el gen dañado a través de múltiples

generaciones de una familia, y luego comparar la información reunida de muchas de estas familias para reducir la posición en el cromosoma humano donde el gen está más probablemente localizado.

Mientras que los aspectos moleculares del análisis de ligamiento reciben frecuentemente más atención, los aspectos clínicos son igualmente importantes. Médicos que están muy familiarizados con FOP deben examinar cuidadosamente a cada miembro de una familia multigeneracional, para indagar exactamente quienes están afectados por FOP y quienes no lo están y para determinar cuan severamente se encuentran afectados. Esto parece trivial, pero es tal vez la parte más engañosa de toda la evaluación, y es tan crítica como el análisis molecular. Si un miembro de una familia multigeneracional está diagnosticado incorrectamente, como afectado o no afectado por FOP (como algunas veces los síntomas pueden ser muy leves en personas jóvenes, tal como, dedos del pie con ligeras malformaciones pero sin otros signos de FOP), la integridad de la totalidad del análisis de ligamiento genético puede ser riesgosa. Por esto, los esfuerzos bien coordinados son críticos en la evaluación de cada miembro de una familia multigeneracional así como la obtención de muestras de ADN y análisis moleculares.

Familias multigeneracionales y estudios de localización del gen de FOP

Hay actualmente cuatro familias FOP multigeneracionales centrales que son críticas para la localización del gen de FOP, así como otras siete familias multigeneracionales adicionales que apoyan la búsqueda de este gen. Cada una de estas once familias es importante para la investigación en FOP. No obstante, la “familia de oro” en términos de la investigación sería una familia que tuviera múltiples pacientes con FOP y hermanos no afectados a lo largo de tres o cuatro generaciones. Hasta la fecha no se ha descubierto una familia como esta. Mientras que es posible que alguna de estas familias sea encontrada, las chances son en general escasas. Una de estas extensas familias multigeneracionales por sí misma, nos posibilitaría localizar el gen de FOP.

La familia multigeneracional número once fue localizada el año pasado en Korea del Sur. Los pacientes fueron examinados, se obtuvieron muestras de DNA para el análisis de ligamiento, y se realizó un extenso análisis de ligamiento genético. Los datos de esta nueva familia nos

permitieron disminuir el locus para el gen de FOP, a pesar de que aún resta un intervalo bastante amplio de alrededor de la mitad del 1% de la totalidad del genoma humano. Imaginen una ruta de 3000 millas entre costa y costa de los Estados Unidos que represente la totalidad del genoma humano. Dos años atrás, redujimos la localización del gen FOP a 100 millas de ancho; el año pasado lo hicimos a 60 millas de ancho y este año a 30 millas. Todavía debemos encontrar la calle, la casa, la habitación y el armario en el cual el gen de FOP se esconde; pero 30 millas es mejor que 3000. Todavía tenemos millas para andar.

Actualmente, se están realizando análisis de amplia escala de ligamiento genético en la Universidad de Pennsylvania y en la de Oxford en un esfuerzo de investigación colaborativo. Más familias multigeneracionales serán sumamente útiles en este esfuerzo, por lo que se están realizando programas pilotos de búsqueda en la India, Brasil y Bangladesh en este momento.

Análisis de genes candidato

Los genes candidato son aquellos, que al mutar, pueden plausiblemente causar una condición genética. Durante el pasado año, continuamos buscando genes candidatos para FOP dentro de la región de ligamiento reducida, así como dentro de las vías funcionales candidatas. Los genes candidato incluyen aquellos genes que están involucrados en la vía de señalización de la proteína morfogénica ósea, genes que controlan el desarrollo esquelético, así como los genes involucrados en la regulación de los sistemas inmunes tanto innato como adaptativo. Hemos logrado excluir, a través de nuestros esfuerzos de secuenciación de objetivos de ADN, varios genes candidato promisorios, pero continuamos evaluando varios nuevos cada año en la búsqueda del verdadero gen de FOP. Mientras que la secuenciación de partes de ADN objetivo de genes candidato promisorios es laboriosa, es esencial que no dejemos genes potenciales de FOP sin investigar. Este trabajo se encuentra patrocinado por la beca FOP de la Whitney Weldom – Stephen Roach y la Fundación Weldom Family.

Enfermedad ósea “Gotera de cera de velas”

La potencia del análisis de ligamiento y la búsqueda de genes candidato se ejemplifica por un

estimulante descubrimiento del año pasado de colegas de Bélgica. La melorreostosis (que literalmente significa “goteras de cera de velas”), es una rara condición genética infantil que afecta el esqueleto y el tejido blando, fundamentalmente en las extremidades. Esta enfermedad está caracterizada por la formación de nuevos huesos que parecen correr como goteras de cera de velas en la cara exterior de los huesos largos. Las lesiones son generalmente asimétricas y pueden involucrar una sola extremidad o varias. Se encuentran muchas veces acompañadas por el endurecimiento del tejido blando adyacente asociado con contracturas de las articulaciones, atrofia muscular, inflamaciones en el tejido blando y dolor.

Usando técnicas de análisis de ligamiento corrientes (idénticas a la aproximación que estamos usando para localizar el gen de FOP) en tres familias multigeneracionales (no tenemos familias multigeneracionales extensas con FOP), investigadores de Bélgica redujeron la localización del gen de la melorreostosis a un muy pequeños intervalo en uno de los cromosomas humanos. Su estudio fue ayudado tremendamente por un paciente que tiene adicionalmente una rotura en uno de los cromosomas que permite a los científicos señalar con precisión la localización del gen de la melorreostosis. Así, utilizando un abordaje de genes candidato en el intervalo de ligamiento que abarcaran la región de rotura, los investigadores descubrieron el gen de la melorreostosis.

El gen más promisorio en el intervalo de ligamiento era un gen en la vía de señalización de la proteína morfogenética ósea denominada SANE (Smad1 Antagonista Efecto) que fue también un candidato para el gen de FOP. De hecho, el trabajo que asoció SANE con la vía de señalización de BMP (mucho antes de que fuera descubierto que era el gen de la melorreostosis) fue realizada por los Drs. Hui-Chuan Huang y Peter Klein en la Escuela de Medicina de la Universidad de Pennsylvania, y fue financiado por una beca de desarrollo del Centro de Investigación en FOP y desordenes relacionados! Mientras que SANE (también denominado MAN1 o LEMD3) no es el gen de FOP, es el gen de la melorreostosis. El descubrimiento de este gen, subraya de que manera la investigación en FOP ha provisto un entendimiento fundamental para enfermedades óseas relacionadas. Los científicos pueden ahora comenzar a desarrollar un modelo animal para la melorreostosis utilizando el conocimiento obtenido de la mutación del gen SANE. Con un modelo animal semejante, las pruebas de drogas para la melorreostosis serán

aceleradas. El descubrimiento del gen de la melorreostosis, un gen de la vía de señalización de BMP, una vez más demuestra la poderosa conexión entre distintas ramas de investigación básica y en la utilización de este conocimiento para avanzar en terapias efectivas que ayudarán a otros.

II. VIAS

La vía de señalización de BMP4

El establecimiento de un tratamiento efectivo para FOP resultará de la identificación tanto de la mutación del gen como de la desregulación de la vía de señalización que causan FOP. Para FOP, la genealogía de familias es escasa y por lo tanto, el ligamiento genético y la clonación posicional es difícil. Un abordaje complementario para identificar la patología primaria en FOP, involucra estrategias para identificar la desregulación en la vía molecular en las células FOP, y desde ahí buscar el gen dañado. Hemos determinado que la vía de señalización de BMP está profundamente desregulada en las células de pacientes con FOP, y juega un rol importante en la patogénesis de la osificación heterotópica en FOP.

El año pasado, aportamos un conocimiento importante referido a la vía de señalización en células normales, y para quienes estén interesados, recomendamos la lectura de las siguientes secciones del 13º Informe Anual (www.ifopa.org/español)

1. Qué es un morfogen?
2. Retroalimentación negativa autoregulatorias
3. Desregulación de retroalimentación negativa autoregulatorias en células FOP
4. Desregulación de la vía de BMP4 en FOP
5. Niveles elevados de receptores de BMP en la superficie celular.
6. Obstrucción en el tráfico de receptores BMP en la membrana celular
7. ¿Quiénes son los policías de tráfico de BMP en la membrana celular y cuál es su rol en la señalización de BMP?
8. Cuál es el camino hacia el blanco?

FOP: las células linfoblastoides como un útil sistema-modelo

Muchos de nuestros estudios sobre la vía de señalización de BMP4 en FOP fue realizada en linfocitos derivados de la sangre de pacientes con FOP (células linfoblastoides) en comparación con células linfoblastoides normales tomadas como control. Mientras que los linfocitos están involucrados en la patología temprana de las lesiones de FOP y están de manera segura y rápida disponibles para su estudio, su rol como factores causantes en el proceso de la enfermedad permanece incierto. No obstante, las células linfoblastoides constituyen un sistema modelo para la investigación de la vía de BMP4 en pacientes con FOP.

FOP: un vehículo desenfrenado

Las metáforas tienen la gran posibilidad de mostrar ideas complejas, especialmente en ciencia, y pueden ser útiles para resumir la investigación que estamos llevando a cabo desde hace varios años, sobre la vía de señalización de BMP4 en las células FOP, con una metáfora apropiada, que en este caso es la de un vehículo sin frenos. Ajusten sus cinturones de seguridad!

Imagine en primer lugar, que un linfocito normal es como un auto en correcto funcionamiento (vía de señalización de BMP4 normal), mientras que un linfocito FOP es como un auto que no tiene frenos (Vía de señalización de BMP4 desregulada). En el auto normal, el pedal del acelerador se comprime de acuerdo a la demanda y un interruptor que conecta el pedal del acelerador al del freno se atasca a alta aceleración (incremento de BMP4), y el interruptor entre el pedal del acelerador y el del freno se desconecta (pérdida de control de retroalimentación negativa en la vía de señalización de BMP4).

En el auto normal, el freno de emergencia (Noggin y Gremlin) se activa cuando el pedal del acelerador está comprimido completamente. En el auto FOP, el freno de emergencia falla en activarse cuando el pedal del acelerador está completamente activado (insuficiente secreción de antagonistas de BMP4 en respuesta a la señal de BMP4). Para poner las cosas peor, el

conductor del auto FOP no puede ver la ruta porque hay una sombra sobre el parabrisas que oscurece parcialmente (falla de las células FOP para medir apropiadamente las concentraciones de BMP4 en el entorno). Por lo tanto, es imposible andar de manera segura en el auto FOP.

El estado del arte de la computadora de abordo (la capacidad de las células de monitorear su propia actividad) informan al conductor del auto normal, que el motor de 8 cilindros (receptores de BMP) se encuentran funcionando apropiadamente, mientras que la computadora de abordo en el auto FOP, informa sorprendentemente a su conductor, que tiene funcionando 48 cilindros (un incremento de 6 veces en los receptores de BMP en las células FOP). Como resultado de esto, el auto FOP no sólo se encuentra andando a alta velocidad, sino que comienza a volcar en el camino y a caer por el barranco (incremento e inapropiada señalización de la vía corriente abajo en células FOP).

En completa desesperación, el conductor del auto FOP trata de colocar el auto en punto muerto, pero no puede hacerlo (falla en la subregulación e internalización de los sobreactivos receptores de BMP en la presencia de BMP4 “ligand”), y el motor continúa andando echando humo (receptor fosforilación promiscuo en ausencia de “ligand”). En un último intento para apagar la llave de arranque (la llave del esqueleto), el conductor del auto FOP encuentra que la llave se encuentra trabada y el circuito eléctrico no es accesible (tenemos actualmente un escaso conocimiento de las moléculas asociadas al receptor inmediatamente corriente arriba o corriente abajo de los receptores de BMP en células FOP y control). El auto continúa su carrera a altísima velocidad bajo un empinado barranco (células musculares heridas), y el auto vuelca y explota (muerte de células musculares y edema resultante).

Un extinguidor de fuego (prednisona) es usado inmediatamente para apagar las llamas y el escuadrón de rescate local y de escombros (el sistema inmune y de reparación del cuerpo) inmediatamente aparece en la escena del accidente (formando tejido cicatrizante y hueso). Una vez que la escena del accidente se encuentra acordonada y las llamas extinguidas, partes de los escombros son llevados al negocio de salvamento (el laboratorio) y las etapas del

accidente son reconstruidas. El proyecto del auto (el genoma humano) es estudiado para averiguar cuales son las partes que pueden al fallar, causar el malogrado viaje del desenfrenado auto. Estudiando este auto en un laboratorio de prueba de choques (el laboratorio de FOP donde el estudio de la vía de señalización de BMP es examinada en células linfoblastoides), la parte rota (insuficiente o dañada codificación de proteína debido al gen mutado) que lleva al choque catastrófico (brote) pueda eventualmente ser identificado.

Aún cuando que la metáfora del auto desenfrenado puede ser usada de manera limitada, nos provee una novedosa perspectiva para entender el abordaje de los sistemas integrados que pueden ser usados para descifrar y entender el complejo trabajo sobre la vía de señalización de BMP4 desregulada en células FOP. También ilustra sobre como una compleja serie de eventos puede magnificar y conducir a resultados catastróficos cuando los críticos interruptores de retroalimentación negativa están rotos y los sistemas de seguridad corriente abajo están genéticamente disminuidos. Actualmente, estamos intentando descifrar la atractiva serie de componentes desregulados de la vía de señalización de BMP4 en células FOP, para poder identificar el componente singular (proteína) controlada por un gen maestro que coloca al auto sin frenos en su peligroso y fatídico camino.

Un velocímetro para monitorear el vehículo FOP sin frenos

Si las células FOP son como vehículos sin frenos, autónomos, independientes y que fallan en responder a controles de retroalimentación normales como sucede en células normales, entonces sería de gran ayuda tener una “lectura en voz alta” o un velocímetro para medir la dirección y magnitud de ese fallido manejo. Más aún, ese velocímetro sería de gran ayuda en medir las respuestas de nuevas terapias investigadas en primer lugar a nivel celular. Este año, Jennifer Fiori, una profesional del laboratorio de FOP, descubrió un indicador confiable o “velocímetro molecular” de la vía de señalización de BMP4 en células FOP. El “velocímetro” consiste en dos genes denominados ID1 e ID3 que funcionan como un temprano sistema de respuesta para la actividad de BMP. Jen mostró que el sistema ID provee una relevante, confiable y poderosa lectura de la actividad de la vía de BMP4 corriente abajo en células linfoblastoides FOP y control. Este es un descubrimiento importante dado que provee los

medios para monitorear experimentalmente y manipular la terapéutica de la vía de señalización de BMP4 in células FOP y control.

Investigación presente y futura en la comprensión del problema mecánico primario en el vehículo sin frenos

Nuestra actual hipótesis es que la actividad desregulada del receptor de BMP y el tráfico, juegan un rol clave en la patogénesis de FOP. Nuestra meta es la identificación de la perturbación específica en la vía de señalización de BMP4 en células FOP que conduce a esta señalización desregulada corriente abajo. Nuestros fines específicos son:

1. Caracterización de las vías de transducción de señal que son activados por la sobreabundancia de receptores de señalización de BMP en células FOP.
2. Determinación del mecanismo que conduce a la sobreabundancia del receptor de BMP en la superficie de células FOP.
3. Examinar las proteínas asociadas al receptor que diferencialmente interactúan con los receptores de BMP en células FOP y control, y evaluar el rol potencial de estas proteínas en la internalización del receptor.

Un análisis de la patología molecular de la sobreabundancia del receptor de BMP en la superficie de las células FOP (porque el “motor” FOP tiene seis veces más cilindros que el normal) nos proveerá un conocimiento crítico sobre los mecanismos moleculares que subrayan los tempranos eventos en la patogénesis de FOP. Estos estudios fomentarán nuestra meta de largo plazo de elucidar los mecanismos básicos de la inducción normal y desordenada en FOP.

El laboratorio de FOP ha presentado nuevos e importantes hallazgos en este tema en el reciente encuentro anual de la Sociedad Americana de Investigaciones Oseas y de Mineralización. Un artículo científico describiendo este trabajo fue aceptado para ser publicado en el “**Journal of Bone & Mineral Research**”. Este trabajo está siendo patrocinado por la Roemex, la beca Grampian y Allison Weiss y por el Instituto Nacional de Salud (de los Estados Unidos).

**El otorgamiento de un subsidio de investigación del Instituto Nacional de Salud
para la investigación de la desregulación de la señalización de BMP4 en células FOP**

El laboratorio de FOP recibió buenas noticias del NIH (Instituto Nacional de Salud) el año pasado, cuando fuimos informados que un subsidio de cuatro años fue otorgado para financiar la ampliación de los estudios sobre la desregulación de la vía de señalización de BMP4 en células FOP. El Comité de Revisión del NIH consideró que las realizaciones hechas por el laboratorio FOP eran importantes y que había una alta probabilidad de producir valiosa información adicional, sobre la patología molecular de FOP y otras condiciones relacionadas. Estamos profundamente agradecidos por este importante subsidio de investigación.

Estudios de Microchips de Expresión Genética a Gran Escala

Durante varios años pasados, los estudios de microchips de expresión genética a gran escala y los análisis computarizados a alta velocidad de las bases de datos comparativas del genoma, nos hicieron posible la comparación de la expresión de patrones de cientos de genes en células FOP y control. Esto continúa siendo un extremadamente importante abordaje para descifrar el diagrama de cableado de las células FOP, esencialmente en la computadora de abordaje en el vehículo FOP sin frenos. En la experimentación de microchips, la dificultad ya no reside en la tecnología, sino más bien en la enormidad de los datos a analizar, dado que cada experimento genera de cientos a miles de datos individuales.

Durante el 2004, la Dra. Gisela Melcon, una compañera posdoctoral con experiencia en experimentación de microchips y análisis, se unió a nuestro laboratorio. La Dra Melcon, descubrió la expresión de varios grupos de genes que aparecen curiosamente diferentes en células FOP en comparación con células control. Es aún muy pronto para determinar exactamente lo que estas diferencias en la expresión de los grupos de genes significa, pero nos puede proveer pistas importantes en relación a las diferencias funcionales en la actividad de la crítica vía de señalización en células FOP y control.

La investigación en FOP está además tratando de descifrar el diagrama de cableado del vehículo sin frenos construido por un “terrorista molecular” (el gen FOP mutado), de manera que podamos determinar más efectivamente como se incapacita antes de causar daño.

III. CELULAS

Tejido específico en células FOP blanco

Para poder resolver el acertijo de FOP, es esencial el determinar no sólo la exacta causa molecular del vehículo sin frenos (vía BMP4 sobreactiva en células FOP), sino también determinar el sitio exacto en el cual el auto choca (cuáles células reciben y procesan las señales anormales que conducen a la formación de hueso heterotópico). El definir el origen exacto de las células de lesiones FOP podría representar un conocimiento fundamental en la investigación en FOP, dado que sugeriría blancos precisos y “cautelosas estrategias” para la intervención terapéutica.

Durante los últimos años, nuestros estudios para examinar los orígenes celulares de la formación de cartílago y hueso heterotópico, avanzaron fuertemente y han producido sorprendentes y definitivos nuevos conocimientos. Hallazgos importantes en la naturaleza e identidad de las células receptoras en el músculo esquelético fueron discutidas en el Informe Anual del año pasado (Discernimientos en la Identidad de las Células Blanco de FOP)

Pareciera ahora, que hay varios tipos diferentes de células receptoras dispersas a través de varios tejidos conectivos y músculo esquelético en sí mismo, que tienen la capacidad de responder a una señal de BMP. La identidad completa y sin ambigüedades de estas células y cómo interactúan en el verdadero marco de FOP para causar osificación heterotópica, continúa siendo un principal foco de atención en el laboratorio de FOP. Nuestros datos preliminares sugieren que podría haber algunas grandes sorpresas próximamente. Estén atentos!

Circulación de células osteogénicas en la formación de hueso heterotópico

El año pasado, informamos sobre un nuevo y estimulante descubrimiento en la investigación sobre células madre adultas en FOP (Un e-mail Histórico y un Gran Avance en la Investigación sobre FOP con Células Madre). Durante el año pasado, pusimos mucho esfuerzo en este proyecto. Brevemente, las células de formación potencial ósea, incluyendo precursores del tejido conectivo, pueden ser encontradas en una variedad de tejidos. Sorprendentemente, los precursores celulares fueron identificados en la circulación (células adherentes derivadas de la sangre o BdACs) que pueden producir hueso *in vivo*.

Para probar la hipótesis de que BdACs son más abundantes en pacientes que están predispuestos a la formación de hueso heterotópico, usamos muestras de sangre periférica de pacientes FOP y de personas no afectadas, para determinar los niveles de circulación relativa de estas células precursoras de formación ósea. BdACs fueron identificadas como una subpoblación de células similares a los fibroцитos, células que fueron inicialmente descritas en el contexto de reparación de heridas pero subsecuentemente, encontrados en la participación en una variedad de desordenes relacionados con la formación de un exuberante tejido cicatrizante. Los pacientes con FOP, que han tenido o tienen brotes recientes, tienen un significativamente alto número de BdACs comparado con otros pacientes en período de inactividad de la enfermedad o de otras personas no afectadas. También hemos demostrado a través de ensayos de mineralización y formación ósea que las BdACs de pacientes con FOP son capaces de formar hueso *in vivo*.

Utilizando varias técnicas diferentes, hemos determinado que las BdACs son derivadas de la médula ósea y migran a sitios de inflamación y tejido herido con la resultante formación de hueso heterotópico. La mayor abundancia y potencial osteogénico de BdACs de pacientes con FOP puede presagiar un posible rol patofisiológico para estas células como células osteoprogenitoras. Estos hallazgos fueron informados en una presentación principal en el encuentro anual de la Sociedad Americana para la Investigación Mineral y Osea en Seattle, Washington en Octubre 2004.

Necesidad continua de tejido con lesiones de FOP

Es esencial reiterar que muchos de los más importantes experimentos, hallazgos y descubrimientos del laboratorio FOP en la década pasada, hubieran sido imposibles sin las

importantes muestras de biopsias de FOP que ustedes nos proveyeron tan amablemente. Mientras que en muchos de los experimentos descritos más arriba se utilizaron o muestras de sangre o modelos animales de osificación heterotópica sofisticados, todos fueron basados en los primeros hallazgos en biopsias de tejido lesionado por FOP. Mientras que nos damos cuenta que estas muestras de tejido para biopsias fueron obtenidas antes del diagnóstico definitivo de FOP, y que nunca deben ser obtenidas en forma posterior, estas biopsias nos proveen de un extraordinario conocimiento sobre FOP que de otra manera no podría ser reproducido por ningún otro medio disponible actualmente. Para los que dentro de la comunidad FOP que lean este informe y recuerden biopsias que les hayan practicado y que no las tengamos en el laboratorio de FOP, les pedimos por favor que se contacten con nosotros que los ayudaremos a obtener esas muestras para más investigación. Así como las familias multigeneracionales son tan importantes para el proceso de identificación del gen, y las muestras de sangre son tan importantes para los estudios sobre la vía de BMP y células madre, las biopsias de tejido con lesiones FOP son invaluable para determinar las características de FOP a nivel de los tejidos y celular.

Si usted nos contacta (e-mail: Kamlesh.Rai@uphs.upenn.edu) le proveeremos las formas adecuadas para autorizar a hospitales o clínicas (donde las biopsias fueron realizadas) para obtener las muestras para su estudio.

IV. MODELOS

Un nuevo modelo animal BMP4 transgénico para FOP

La modificación genética de ratones es una herramienta poderosa para el estudio del desarrollo óseo y está comenzando a contribuir sustancialmente a nuestra comprensión de la regulación de la formación del esqueleto. El desarrollo de modelos animales relevantes para FOP será un importante avance en el desarrollo de tratamientos efectivos.

Uno de los más importantes descubrimientos en la investigación en FOP en 2004 fue el trascendente hallazgo de que los ratones que están genéticamente programados para sobreexpresar y secretar BMP4 de células nerviosas desarrollan una condición de formación progresiva de hueso similar a FOP cuando envejecen. Sin embargo, a pesar de que el patrón de formación progresiva de hueso en FOP, que aparece primero en el tronco y luego afecta las extremidades, el patrón

opuesto ocurre en los ratones de BMP4 transgénico en los cuales la osificación heterotópica aparece en las extremidades y luego pasa centralmente al tronco.

Estudios realizados desde la mosca de la fruta hasta los ratones, muestran que las BMP juegan un rol importante no sólo en la formación y reparación del esqueleto (tanto el exoesqueleto de la mosca y el esqueleto interno de los vertebrados), pero también en el desarrollo de otros sistemas orgánicos incluyendo el cerebro. Irónicamente, es la exclusión de las BMP de una región específica en la cabeza y la espalda del embrión (orquestada por las proteínas antagonistas de BMP tales como Noggin, Gremlin, Chordin, Follistatin, DAN, Cerberus y otros) que es primariamente responsable del desarrollo del sistema nervioso central. En el desarrollo más tardío, las BMP recomienzan la pintura, como promotores importantes del crecimiento y desarrollo de varias células que soportan el sistema nervioso. Por lo tanto, no es tan extraño que neurobiólogos del desarrollo puedan estar interesados en estudiar el rol de BMP en el desarrollo del sistema nervioso. Uno de estos prominentes grupos, liderado por el Dr Kack Kessler, profesor de neurociencias en la Northwestern University en Chicago, estaba interesado de hecho, en el rol específico de BMP4 en el desarrollo del sistema nervioso.

La ausencia completa de BMP4 es una mutación letal bien conocida en la embriogénesis temprana. Animales tales como ratones o seres humanos, simplemente no se pueden desarrollar sin la proteína BMP4. Sin embargo, el efecto en la maduración del sistema nervioso de BMP4 excesivo, no era conocido y el grupo liderado por el Dr. Kessler produjo un ratón transgénico por medio de la ingeniería genética para sobreexpresar y secretar BMP4 primariamente de las células nerviosas maduras para poder analizar esa cuestión. Los resultados iniciales fueron interesantes. Examinando secciones microscópicas del cerebro del animal, el grupo del Dr. Kessler notó algunos cambios sutiles en varias poblaciones de células gliales que sostienen el crecimiento y desarrollo de las células nerviosas. Sin embargo, los animales no manifestaron ningún cambio evidente en su comportamiento. Los autores publicaron sus hallazgos en la revista "Development" (Desarrollo) y han finalizado esencialmente su trabajo. Es ahora cuando la historia se pone realmente interesante!

Un joven colaborador postdoctoral llamado Lixin Kan, se unió al Laboratorio Kessler. Un día, mientras que se encontraba visitando la colonia de animales del laboratorio, notó que algo inusual sucedía con el envejecimiento de los ratones con BMP4 transgénico, que no habían sido usados para estudios neurológicos. Este investigador, notó que los ratones habían desarrollado fuertes inflamaciones en sus patas traseras y en el abdomen. También notó que los ratones parecían inusualmente rígidos. Logró hacer poner la atención de los demás miembros del laboratorio sobre estos hallazgos, que estaban menos entusiasmados en estos “tumores” dado que no estaban asociados con hallazgos neurológicos obvios. Adicionalmente, los veterinarios que se encontraban al cuidado de esta colonia animal, sugirieron fuertemente, que estos ratones debían ser sacrificados, dado que tenían “tumores crecientes”. No obstante, el Dr Kan, decidió continuar el análisis y obtener radiografías de los animales. Estas radiografías mostraron que los “tumores” no eran cáncer, sino hueso heterotópico! Estudios microscópicos confirmaron que las lesiones eran sin lugar a dudas, osificación heterotópica y estaban siendo formadas en proceso endocondral, de manera idéntica a las etapas de la formación de la lesión de FOP y a las etapas de la osificación heterotópica inducida por la implantación de BMP4 previamente informada.

El hallazgo más importante fue, sin embargo, que la osificación heterotópica era progresiva, y diferente del patrón de progresión observado en los pacientes con FOP. También se observó que los animales no desarrollaron osificación heterotópica en la lengua, ni el diafragma, o en los músculos extraoculares, músculos que también se encuentran libres en FOP.

De manera interesante, la mayor parte de las lesiones parecen ser bastante superficiales y sólo secundariamente involucran las estructuras musculares más profundas. La tasa de progresión varió fuertemente entre animales, aún en los de bases genéticas similares, sugiriendo que un componente medioambiental o inmunológico o ambos debería ser el responsable de las diferencias. En todos los casos, las lesiones tempranas fueron acompañadas por inflamación masiva y edema en el tejido blando, muy similar a la vista en las lesiones tempranas de FOP. En todos los casos en los cuales la osificación heterotópica progresó en el músculo esquelético, infiltraciones evanescentes de linfocitos fueron notadas, muy parecidas a las lesiones de FOP. Cuando los animales BMP4 transgénicos fueron apareados con animales transgénicos que

sobreexpresaban el antagonista de BMP Noggin, la osificación heterotópica fue prevenida, indicando el rol específico de BMP4 en la patogénesis de la enfermedad similar a FOP en estos animales.

Mientras que los animales BMP4 transgénicos no tuvieron una mutación natural, fueron modificados por ingeniería genética para sobre producir y secretar BMP4 de las células nerviosas. De este modo, el sistema nervioso puede actuar como un vehículo para distribuir BMP4 en los tejidos locales. El hueso formado en esas circunstancias no fue una gran sorpresa, pero que haya progresado en un patrón anatómico específico sin duda si lo fue. También el patrón de osificación heterotópica progresiva en los ratones transgénicos fue bastante diferente del patrón visto en pacientes con FOP, un hallazgo que sugiere muchas preguntas sobre la dinámica de la entrega de BMP, de la naturaleza de las células receptoras en los tejidos locales, y de las diferencias de desarrollo entre ratones y seres humanos.

Es particularmente instructivo notar que los animales BMP4 transgénicos, no tienen ninguna anomalía obvia en su esqueleto normal. Específicamente, los dedos grandes del pie son normales. Sospechamos que la razón para que esto sea así es que el modelo de cartílago del esqueleto normal está completamente formado antes de que la producción extra de BMP4 sea cambiada en los ratones transgénicos. Además el patrón de osificación heterotópica post natal en los ratones BMP4 transgénicos es casi seguro que nos muestra el campo de progenitores receptivos o células madre adultas que residen en los tejidos del cuerpo y que responden a los niveles elevados crónicamente de BMP4.

Se han establecido grandes contribuciones entre el equipo de investigación en neurobiología en Northwestern y el equipo de investigación en FOP en la Universidad de Pennsylvania. Se iniciará una investigación colaborativa a través de la exploración de las fuentes de células receptoras que contribuyen a la formación de hueso en los ratones transgénicos, la sensibilidad de la osificación heterotópica a las inmunizaciones intramusculares, la variabilidad en las tasas de la progresión de la enfermedad entre animales, y la prueba de drogas existentes que podrían tener un impacto beneficioso en la progresión de la osificación heterotópica. El potencial para investigación

adicional utilizando este modelo animal es enorme y el importante descubrimiento del modelo animal es extremadamente estimulante para todos en la comunidad FOP.

Este nuevo esfuerzo de investigación colaborativa es financiado por el Programa de Becas de Desarrollo del Centro de Investigación en FOP y enfermedades relacionadas.

V. DISPARADORES

Características autoinmunes de FOP y la Vía desregulada de BMP4

Mientras que la mutación causativa de FOP permanece desconocida, una vía de señalización de BMP4 sobre activa y desregulada ha sido implicada en la fisiopatología de la enfermedad y provee una base racional para comprender tanto la osificación heterotópica como las malformaciones esqueléticas congénitas que son rasgos de la enfermedad.

A pesar de la satisfactoria concordancia de estas características postnatales y de desarrollo de FOP con anormalidades en la vía de señalización de BMP4, evidencias de todos los niveles de investigación, implican fuertemente el involucramiento del sistema inmune en la patogénesis de la enfermedad. La presencia de linfocitos y mastocitos en las lesiones tempranas de FOP, linfocitos asociados a la muerte del tejido músculo esquelético, surgimiento de brotes a continuación de infecciones virales e inmunizaciones, el errático momento de ocurrencia de los brotes y la respuesta beneficiosa de los brotes tempranos a los corticosteroides, son todas importantes evidencias que implican al sistema inmune en la patogénesis de los brotes de FOP. Más aún, estas características clínicas, sugieren fuertemente un componente autoinmune a las condiciones, tal vez, un disparador autoinmune. Características clínicas autoinmunes de FOP no están sustentadas por hipótesis que focalizan únicamente en la desregulación de la vía de señalización de BMP4, a pesar de que semejantes posibilidades ciertamente existen.

Una hipótesis central sugiere que las características inmunológicas de FOP deben ser debidas a los trastornos en la regulación del sistema inmune en pacientes con FOP, relacionados plausiblemente a la mutación de un gen en la vía de señalización de BMP4. Numerosos

estudios demuestran un rol clave para la vía de señalización de BMP4 en el desarrollo y regulación del sistema inmune adaptativo y estudios recientes proveen una fuerte evidencia de la ligazón entre las vías corriente abajo que regulan la señal de BMP y las vías que regulan señales en el sistema inmune innato, la antigua rama del sistema inmune que regula la inflamación y reparación de heridas.

Tomándolo de manera conjunta, un amplio cuerpo de datos implican fuertemente la vía de señalización de BMP en el desarrollo y regulación tanto del sistema inmune innato y el adaptativo. Hipotetizamos que las características inmunológicas de FOP son debidas a trastornos en la regulación del sistema inmune innato o adaptativo en los pacientes con FOP. Varios escenarios pueden plausiblemente conducir a las llamativas características inmunológicas de FOP y son ahora sujeto de investigación intensa en el laboratorio de FOP.

Un extenso trabajo sobre esta nueva frontera de la investigación en FOP está comenzando a revelar nuevos conocimientos no anticipados sobre la fisiopatología y variabilidad de esta discapacitante enfermedad. Este trabajo está siendo generosamente financiado por The Born-Lotke-Zasloff Fellowship, la Fundación Ian Cali, y por el Centro de Investigación en FOP y enfermedades relacionadas.

FOP: Conocimientos sobre el trasplante de médula ósea

Uno de los más importantes descubrimientos en la investigación en FOP en 2004 surgió de investigaciones en marcha sobre el rol del sistema inmune en FOP. Un conocimiento único sobre la causa de los brotes de FOP fue provisto por un paciente con FOP que recibió un trasplante de médula ósea varios años atrás por otra condición no relacionada con FOP. Mientras que el trasplante de médula ósea no curó FOP, las observaciones realizadas a este paciente único apoyan la continuación de estudios sobre el rol del sistema inmune en disparar los brotes de FOP y proveen de una base racional para probar inmunomoduladores para la supresión de la actividad de la enfermedad en FOP. Esta aproximación puede ser muy

peligrosa de probar en pacientes con FOP sin primero ser experimentadas en un modelo animal apropiado. La disponibilidad ahora de un modelo animal genéticamente relevante (el ratón FOPPY) para la prueba de drogas que puedan interrumpir la progresión de la osificación heterotópica, hace una aproximación factible en el futuro cercano.

Los nuevos e importantes conocimientos obtenidos de este paciente único, van a obviar la necesidad de realizar experimentos adicionales sobre trasplante de médula ósea en ratones y seres humanos, y nos permitirán eludir años de experimentación cara, peligrosa e innecesaria.

Los datos de este paciente están siendo actualmente evaluados y un largo informe se producirá sobre esto. Mantenemos nuestra actualización en progreso sobre este análisis y sus muy importantes implicancias para la comprensión de la fisiopatología y tratamiento de FOP.

VI. TRATAMIENTOS

La meta final de la investigación en FOP es el desarrollo de tratamientos que puedan prevenir, interrumpir y eventualmente revertir la progresión de la condición.

El horizonte terapéutico para pacientes con FOP es infinitamente más claro que hace una década atrás. A través de los esfuerzos de un equipo colaborativo internacional de investigación en FOP dedicado a estas metas, se continúan haciendo avances fundamentales en la comprensión de la base molecular de la condición, y en el conocimiento de los detalles genéticos, celulares, moleculares, fisiológicos y de los cambios de desarrollo que caracterizan FOP. Desde este horizonte, van a surgir mejores soluciones.

Mientras tanto, el trabajo continúa paralelamente tanto en los frentes de ciencia básica como en tratamientos para avanzar en la terapia de FOP. El descubrimiento del año pasado de un animal BMP4 transgénico que desarrolla osificación heterotópica progresiva abre la puerta para la prueba de muchas medicaciones actualmente disponibles para disminuir la respuesta

celular y del tejido a la cascada de señalización de BMP crónicamente activa.

El manejo médico de FOP: Consideraciones actuales de tratamientos

La tercera edición del **Manejo Médico de FOP: Consideraciones actuales de tratamientos**, (también conocida como **La Guía de Tratamientos de FOP**) fue completada en diciembre de 2004 y puesta en el sitio web de IFOPA en enero de 2005.

El documento fue actualizado específicamente para comunicar nuevos y relevantes datos sobre la medicación anti inflamatoria no esteroide, los inhibidores de cox-2, los aminobisfosfonatos, y la vacuna contra la gripe. Debido a la generosa ayuda de amigos y traductores, el documento está siendo traducido en siete idiomas. Le sugerimos a todos los que no hayan visto el documento hasta ahora, que lo lean, y lo bajen del sitio web de IFOPA (www.ifopa.org). Una copia impresa puede obtenerse a través de contactar a la asistente del Dr Kaplan, Kamlesh Rai a kamlesh.ra@uphs.upenn.edu.

Todos los médicos que se encuentren asistiendo a un paciente con FOP deben revisar constantemente información científica y diagramar el curso más seguro y responsable para el paciente hasta que medicaciones definitivas se encuentren disponibles y su seguridad y eficiencia sea verificada. El tratamiento óptimo para FOP estará basado en el conocimiento integrado de la fisiopatología celular y molecular de la condición y cambiará mientras que nuevos descubrimientos surjan.

Cuatro avances en la investigación sobre tratamientos para FOP en 2004

Durante 2004 hubo cuatro avances principales en la investigación sobre tratamientos para FOP. Estos son:

1. El descubrimiento de un modelo animal genéticamente base de osificación heterotópica progresiva (el ratón FOPPY) que nos permitirá probar medicamentos tanto experimentales como actualmente disponibles.

2. La investigación para identificar los inhibidores de la transducción de señales (STIs) que interfieren con los blancos moleculares en la vía de señalización de BMP4.
3. El desarrollo de promotores inductibles para pruebas pre-clínicas de terapia génica noggin regulada.
4. El descubrimiento del rol del sistema inmune como un disparador muy sensitivo pero no específico de los brotes de FOP. Este hallazgo va a estimular pruebas clínicas de una nueva clase de drogas denominadas inmunomoduladores en la prevención de los brotes de FOP.

El ratón FOPPY:

La necesidad de probar cuidadosamente drogas nuevas en modelos animales, antes de la realización de pruebas clínicas en pacientes, fue reconocida hace aproximadamente 100 años. Sin embargo, hay situaciones en las cuales las pruebas en animales fallan en predecir con precisión si una droga será efectiva en las personas y la única prueba precisa puede ser realizada en pacientes y controles normales. Muchas drogas que tienen efectos poderosos en modelos animales son útiles o peligrosas en seres humanos y muchas drogas que no tienen efectos en un modelo animal tienen efectos terapéuticos poderosos en enfermedades humanas. No obstante, es importante cuando sea posible por seguridad y razones éticas, el probar las principales nuevas categorías de drogas en modelos animales antes de probarlas en pacientes.

Uno de los más importantes avances en la investigación en FOP en 2004, fue el descubrimiento de modelo animal transgénico, el ratón FOPPY, para pruebas actualmente disponibles y medicaciones experimentales. Aunque los ratones FOPPY no tienen FOP y el patrón de progresión de la enfermedad es diferente al visto en FOP, el desarrollo de la progresión de la osificación heterotópica en cualquier patrón provee una gran mejora en los actualmente existentes modelos animales. Por lo tanto, los ratones FOPPY nos permitirán probar drogas actualmente existentes tales como prednisona, medicamentos anti-inflamatorios, inhibidores de mastocitos, inhibidores de cox-2, aminobisfosfonatos, inhibidores de la transducción de la señal, agentes anti-angiogénicos, e inmunomoduladores.

Las colonias de ratones FOPPY serán expandidas en las Universidades Northwestern y de Pennsylvania para poder realizar estos estudios.

Inhibidores de transducción de la señal

Los inhibidores de transducción de señal (STIs) son drogas que inhiben señales de transducción en las vías. Esta nueva clase de medicamentos recibieron mucha atención varios años atrás en un show televisivo popular, *El viento del oeste*, cuando el presidente Barlett consideró una campaña para eliminar el cáncer basada en nueva evidencia que indicaba que una inhibición en la señal de transducción podía curar algunos tipos de cáncer.

Entre todos los tipos de STIs, el que recibió mayor atención fue Imatinib (Gleevec), una pequeña molécula de droga que inhibe una clase específica de receptores de transmembrana llamados proteína tirosina cinasa. El Imatinib puede ser suministrado oralmente con escasa cantidad de efectos colaterales y se ha convertido en el medicamento standard para el tratamiento de pacientes con leucemia mielógena crónica. Mientras que Imatinib no debe ser aplicable al tratamiento de FOP, otras drogas pueden inhibir la vía de la serina treonina cinasa (la vía involucrada en la transducción de la señal de BMP4) puede ser relevante para FOP. Por ejemplo, el antagonista de BMP, Noggin es un inhibidor de transducción de señal dado que afecta la porción extracelular de la vía de transducción de señal a través de bloquear la habilidad de BMP para vincularse a su receptor. Varios de estos descubrimientos durante el pasado año en la vía de la transducción de la señal de BMP4 en las células FOP (el auto sin control) se han indentificado nuevas drogas blanco en la vía de señalización de BMP4 que podrían eventualmente probar ser aún mejores que Noggin.

Así como un modelo animal relevante es necesario para probar efectos *in vivo* de drogas actualmente existentes o nuevos desarrollos de drogas, una alta capacidad de procesamiento del sistema de prueba de drogas al nivel celular, es necesario para investigar los compuestos que deben ser desarrollados como drogas. Mucho de nuestro trabajo durante varios de los pasados años sobre los estudios de la vía de transducción de la señal de BMP, está basado en

la identificación de esos blancos tangibles. Nuevos sistemas de pruebas *in vitro* estarán basados en las claras y grandes diferencias en el fenotipo molecular entre las células FOP (auto fuera de control) y las células control (moderado por ejemplo por el “velocímetro molecular” de los genes ID, discutido previamente en la **Sección III** de este informe). Continuaremos prestando mucha atención en la identificación de blancos terapéuticos apropiados en la vía de transducción de la señal de BMP4 y en la identificación de inhibidores de la señal para bloquear esos blancos.

Terapia génica: desarrollo de vectores virales seguros

En 2003, describimos la publicación de un hito “prueba de concepto” utilizando terapia génica con noggin en un modelo animal relevante para FOP. Este estudio demostró que la entrega de una proteína Noggin modificada a través del abordaje de una terapia génica sistémica logró prevenir satisfactoriamente la osificación heterotópica inducida por BMP4 en un ratón modelo.

Esta principal novedad singular probó el concepto que el gen noggin puede ser modificado para permitir la entrega sistémica de la proteína biológicamente modificada por ingeniería genética, que el gen puede insertarse en un vector viral de entrega, que el vector viral que lleva el gen noggin modificado puede ser introducido en el torrente sanguíneo, que puede viajar al hígado donde es introducido en sus células, que el hígado puede actuar como una fábrica para producir una forma activa de la proteína Noggin modificada, que la proteína Noggin modificada puede circular sistemáticamente como una hormona, y que a concentraciones terapéuticas la proteína Noggin modificada puede vincular efectivamente e inactivar niveles ambientales de BMP4 recombinante humana y bloquear completamente la formación de la más rudimentaria lesión semejante de FOP.

Mientras que la posibilidad de usar una forma de la terapia génica con noggin para tratar pacientes con FOP es promisorio, hay numerosos desafíos, algunos específicos de FOP y otros generales del campo de la terapia génica, que necesitan ser resueltos antes de que la terapia

génica pueda ser una realidad. El mayor desafío que ésta presenta puede ser resumido en tres palabras: entrega, entrega, entrega! El desarrollo y uso de vectores virales seguros para la entrega del gen noggin será crítico en la consideración de si el gen noggin o el noggin modificado pueden ser suministrados a través de un sistema base viral de entrega para uso en seres humanos.

Nuestros colegas en la División de Genética Humana en la Universidad de Pensylvania, aislaron nuevos virus adeno- asociados y están desarrollándolos como vectores para terapia génica humana. En general, los virus adeno- asociados son menos tóxicos para el organismo que los adenovirus (pero todavía tienen cierta toxicidad) y tienen una reacción menos importante del sistema inmune. La esperanza era que estos nuevos virus adeno- asociados podrían ser desarrollados como vectores para la terapia génica en humanos, que hubieran mejorado la eficiencia de la transferencia génica y que no hubieran sido reconocidos por los anticuerpos generados para las infecciones de virus adeno- asociados en seres humanos. Durante los dos años pasados usamos con éxito estos nuevos vectores de entrega en nuestros experimentos de terapia génica noggin modificada en estudios en animales.

Los estudios de toxicidad en ratones usando el nuevo sistema de entrega con un vector de virus adeno- asociado (AAV) indican que aunque los vectores de virus adeno-asociado inducen menos inflamación en el hígado que los adenovirus, la proteína Noggin y la proteína Noggin modificada por sí mismas pueden ser tóxicas a altos dosajes sostenidos. Estos hallazgos son compatibles con los estudios que muestran que las BMPs son importantes en el desarrollo y mantenimiento del hígado, la sangre, el oído y el ojo. Por lo tanto, si Noggin es considerada para el uso en seres humanos, deberá ser regulada de manera precisa y debe ser mantenida en los niveles más efectivos posibles durante los menores períodos de tiempo para inhibir la osificación heterotópica. Como resultado de esto, es esencial el desarrollo de sistemas inductibles y regulados para la producción de Noggin y luego hacer blanco con la terapia génica hacia células que sean o bien blancos de la acción de BMP o hacia células que se encuentren en la vecindad de los blancos de BMP.

Terapia génica: producción de Noggin regulada e inductible

En el Informe Anual del año pasado, anotamos que estábamos trabajando para aplicar promotores de genes inductibles para regular el tiempo de ocurrencia y el dosaje de la terapia génica con noggin. Estamos entusiasmados de anunciar que hacia fines de 2004 contamos con estos promotores inductibles altamente sofisticados para regular el gen noggin.

Dado que Noggin es un antagonista de múltiples BMPs y que los BMPs cumplen roles importantes fuera del sistema esquelético, mucho Noggin puede perjudicar la función de otros órganos. En esencia, mientras que mucho BMP es malo para el cuerpo, mucho Noggin es también malo para el cuerpo. El cuerpo no tolera excesivas cantidades de nada y requiere que su crítica vía reguladora de moléculas esté balanceada. El desafío por lo tanto, será entender la exacta causa del desbalance en el tráfico y señalización de BMP en FOP y restablecerlo de la manera más segura y efectiva sin entregar una molécula en una mayor concentración que el cuerpo pueda necesitar o tolerar. Sólo con estudios meticulosos utilizando un promotor inductible de noggin (tal como el desarrollado en 2004), en conjunción con el importante descubrimiento del ratón FOPPY, podremos adelantar en la determinación del más seguro y efectivo régimen para bloquear la formación de una lesión semejante a la de FOP.

Todavía no es posible determinar cuando o aún sí la terapia génica con noggin logrará ser una real práctica clínica para los niños o adultos que tienen FOP, pero en el presente es nuestra mayor esperanza y continuaremos persiguiéndola implacablemente hasta que se vuelva una realidad o hasta que mejores soluciones emerjan.

Inhibidores de Cox-2 y drogas antiinflamatorias no esteroides

Los recientes problemas surgidos con los inhibidores de cox-2 (drogas como rofecoxib, celecoxib y valdecoxib) muestra lo difícil que es el desarrollo efectivo y uso seguro de medicamentos que específicamente apunten a moléculas que causan la enfermedad, y mantengan las moléculas sanas completamente inalteradas. Mientras que los beneficios de los inhibidores de cox-2 probablemente pesan más que los riesgos en pacientes jóvenes con FOP,

la preocupación sobre los efectos secundarios cardiovasculares conducen a un abordaje de precaución, especialmente en individuos de edad más avanzada. Los nuevos datos surgidos sobre los inhibidores de cox-2, sus problemas y promesas, fueron claramente discutidos en la actualización de la “Guía de Tratamientos de FOP” (**FOP Treatment Guidelines**) que se encuentra disponible en el sitio web de IFOPA: www.ifopa.org. Lo mantendremos actualizado a lo largo de este año cuando surjan nuevos datos sobre estas importantes clases de drogas para el tratamiento de FOP.

Inmuno moduladores

El hallazgo de que el sistema inmune es un disparador poderoso de los brotes de FOP, nos provee la oportunidad de probar un nuevo conjunto de inmunomoduladores en la prevención de los brotes de FOP. No obstante, no hay suficientes pacientes con FOP en el mundo para probar todas las combinaciones de medicamentos que podríamos querer probar. Los ratones FOPPY nos permitirán probar la efectividad de varias combinaciones de inmunomoduladores para inhibir la osificación heterotópica progresiva de una manera más segura de lo que podría ser la prueba en pacientes. Estas pruebas comenzarán tan pronto como cuando las colonias de animales se hayan expandido y cuando la variabilidad natural de la progresión de la enfermedad en los ratones FOPPY sea comprendida más cabalmente. El conocimiento obtenido de las pruebas en animales nos permitirá evaluar cuales medicamentos o combinaciones de medicamentos deberían ser usadas para prevenir y disminuir la progresión de FOP en los pacientes. Tal como Jeri Licht, la madre de Daniel Licht, estableció de manera tan elocuente en el documental de la **BBC**, la *LLave del Esqueleto* (Skeleton Key), “Ellos necesitan disminuir la velocidad de la progresión de la condición y disminuir o eliminar la formación de hueso cuando los brotes se inician. Luego, tendrán tiempo y todos tendremos el lujo de poder buscar la cura completa de la condición”.

VII. PRESENTACIONES, ENCUENTROS, INFORMES Y PUBLICACIONES

Durante el año 2004, tuvimos el privilegio de presentar importantes conferencias sobre FOP

en:

- Alfred I. Dupont Hospital for Children; Wilmington, Delaware
- American Society for Bone & Mineral Research; Seattle, Washington
- Johnson & Johnson Research Foundation; New Brunswick, New Jersey
- Michigan State University; East Lansing, Michigan
- Orthopaedic Research Society; San Francisco, California
- University of California-Irvine; Irvine, California
- University of Maine; Orono, Maine
- University of Pittsburgh; Pittsburgh, Pennsylvania

Durante el año 2004 fuimos honrados en presentar aspectos destacados de la investigación en FOP en encuentros de familias regionales, nacionales e internacionales en:

- Aberdeen, Scotland
- Iowa City, Iowa
- Los Angeles, California
- Orlando, Florida
- Santa Maria, California
- Sausalito, California
- Solbacka, Sweden
- Valbert, Germany
- West Orange, New Jersey

Otras seis importantes presentaciones sobre FOP y POH fueron realizadas por miembros del Laboratorio de FOP en la Sociedad Americana de Investigación Osea y Mineral (ASBMR) en Seattle, Washington, en octubre 2004. Varios de estos artículos fueron presentados en el principal Plenario de Sesiones del encuentro que contó con la concurrencia de médicos y científicos de todo el mundo.

Artículos en prensa

En el año 2004, se realizaron cinco publicaciones con referato sobre FOP y POH. Varios artículos se encuentran en prensa, o otros en preparación. Recientemente, los directores del Centro de FOP fueron invitados a editar un ejemplar de la revista **Reseñas Clínicas en Metabolismo y Endocrinología (Clinical Reviews In Endocrinology And Metabolism)** dedicada enteramente a FOP. Habrá numerosos artículos sobre aspectos de la clínica y ciencia básica de FOP. Los artículos deberán ser enviados para su publicación en Julio 2005, y la revista será publicada en Diciembre del mismo año.

VIII. SU LABORATORIO DE FOP

Mientras que el corazón del laboratorio de FOP ocupa aproximadamente 2000 pies cuadrados, nuestro espacio virtual se ha expandido en los cinco años pasados con el establecimiento de los componentes internos y externos del Programa de Becas de Desarrollo. A través de este destacado programa, patrocinado por la Fundación de la Familia Cali y administrado a través del Centro de Investigación en FOP y Desordenes Relacionados, estamos posibilitados a expandir las colaboraciones con colegas en varios departamentos y escuelas de la Universidad de Pennsylvania y cualquier otro sitio.

Las fotos de los niños con FOP adornan los corredores de nuestro Laboratorio central y son un recuerdo constante de nuestra misión y nuestras metas. Tal como les decimos a los niños y adultos que visitan el Centro y Laboratorio de FOP, “Este es realmente *su* Centro y Laboratorio”. Nos gusta cuando nos visitan.

Durante el año 2004, el equipo de investigación del Laboratorio de Investigación en FOP Central ha incluido 16 investigadores: cuatro investigadores principales, cuatro investigadores especialistas, cuatro colegas de nivel post-doctoral, dos estudiantes graduados, un estudiante de medicina y un estudiante de pre-medicina. Adicionalmente cuatro estudiantes no graduados y un estudiante de escuela secundaria, fueron voluntarios para trabajar en proyectos de FOP en el laboratorio durante el verano de 2004.

Estuvimos encantados de tener a Michael O'Connell, un estudiante graduado de la Universidad de Southampton (Inglaterra, UK) que visitó nuestro laboratorio este año. Michael se encuentra estudiando el rol de células de superficie heparina sulfato proteoglycans en la modulación de la señalización de BMP4 en células FOP y control. Usted sabrá más sobre este estimulante trabajo cuando se obtengan conclusiones. Michael estará con nosotros en el verano de 2005 y luego retornará a Southampton para finalizar su tesis Doctoral bajo la dirección de su mentor y nuestro colaborador, el Profesor Trudy Roach.

Equipos de Trabajo

El Laboratorio de Investigación en FOP Central está organizado en equipos de trabajo de manera similar a nuestro Informe Anual. Hay grupos de trabajo dedicados a la genética de FOP, a vías de señalización, a diferenciación celular, a inmunología (disparadores) a traducciones (modelos y tratamientos) y a POH. Nuestros grupos de trabajo y encuentros de los integrantes del laboratorio reflejan la división e integración de estas diferentes áreas de investigación científica.

Centro de Investigación en FOP y Desordenes Relacionados

El Centro de Investigación en FOP y Desordenes Relacionados fue establecido en los 90' por la fundación de la Familia Cali con la meta de expandir investigación multidisciplinaria en FOP en otros laboratorios en la Universidad y más recientemente en grupos colaborativos en otras universidades.

En 2005 el Programa de Becas de Desarrollo financiará sus primeras becas de investigación colaborativa externa en el laboratorio del Dr Lixin Kan en la Universidad Northwestern en Chicago, Illinois. Proyectos colaborativos involucrando el linaje de células receptoras para osificación heterotópica y la prueba de terapias experimentales actualmente disponibles para FOP en los nuevos modelos animales BMP4 transgénicos, serán conducidos de manera colaborativa entre las universidades de Pennsylvania y Northwestern.

Desde el inicio, el Programa de Desarrollo de Becas del Centro de Investigación en FOP y Desordenes Relacionados ha financiado 12 nuevos relevantes proyectos relativos a nuestra misión de largo plazo. Varios de estos proyectos fueron destacados en secciones previas de este informe (o en informes previos), y ha producido ya importantes resultados y nuevos conocimientos para la investigación en FOP. El trabajo financiado por el Programa de Becas de Desarrollo en los pasados años ha incluido estudios para identificar las células blanco en la osificación heterotópica inducida por BMP, estudios para caracterizar el rol de la angiogénesis durante la formación del esqueleto, el trabajo para desarrollar vectores virales adeno-asociados más seguros y efectivos para ser utilizados en experimentos de terapia génica con noggin, el trabajo para desarrollar un promotor inductible para la regulación de la entrega de la terapia génica con noggin, estudios para definir el rol de la familia de erizos de morfogenes y el factor de crecimiento de fibroblastos en la señalización de BMP4, estudios para definir el rol de los glucocorticoides en la modulación de la respuesta de antagonistas de BMP en niveles ambientales de BMP4, esfuerzos para el uso de microchips estudios de expresión genética de microchips para determinar la respuesta de condrocitos hacia señales apoptóticas estimuladas por fluoriquinolasa en células de cartílago pre óseas, un proyecto único para evaluar un paciente con FOP que ha recibido un transplante de médula ósea por una condición no relacionada con FOP varios años atrás, y nuevos estudios para comprender el rol de células adherentes derivadas de la sangre en la formación de osificación heterotópica.

X. AGRADECIMIENTOS

FOP continúa siendo uno de los obstáculos e incertidumbres de la condición humana. A pesar de su rareza, creemos realmente que la investigación en FOP es la llave para comprender no sólo FOP, sino también muchas otras condiciones comunes que afectan la formación de hueso y la del esqueleto. Es fundamentalmente la llave del esqueleto.

Como hemos mencionado varias veces, causa y cura son las dos palabras que nos motivan y proveen la principal guía para todo lo que hacemos: el descubrir la exacta causa genética y molecular de FOP y el usar ese conocimiento para desarrollar tratamientos efectivos y algún día la cura. El Centro de FOP y laboratorio central continúa siendo el único recurso tanto para

pacientes y la comunidad médica en el mundo. Nos esforzamos para lograr la excelencia y liderar en todas las áreas vitales para nuestra misión: cuidado de pacientes, educación y la generación de nuevo conocimiento.

Resumiendo, el año 2004 fue un año de desarrollos principales para la investigación en FOP y fue destacado por el descubrimiento de un nuevo modelo animal transgénico para la investigación en FOP que nos permitirá la prueba de drogas experimentales y actualmente disponibles, por la clarificación del rol del sistema inmune en disparar los brotes de FOP, por el descubrimiento de una nueva familia multigeneracional que nos permitió reducir la región cromosómica en la cual el gen de FOP se encontraría ubicado, por la continuidad de descubrimientos seminales sobre la desregulación de los receptores de señalización y tráfico de BMP en células FOP, por nuevos e importantes conocimientos de potentes experimentos de microships en FOP, por una mayor comprensión del rol de células adherentes derivadas de la sangre en la osificación heterotópica, por la identificación de blancos terapéuticos potenciales en la vía de transducción de la señal de BMP, por el desarrollo de sistemas de entrega virales adeno-asociados más seguros para la terapia génica con noggin en FOP, y por la muy estimulante y por largo tiempo esperado desarrollo de un gen promotor inductible para la regulación de la terapia génica con noggin en FOP. Como antes, tenemos mucho trabajo todavía para realizar y una cima para alcanzar. Esperamos que el 2005 sea también un año de grandes hitos en la investigación en FOP y que avances y descubrimientos importantes puedan destacar lo realizado.

La comunidad de investigación en FOP ha realizado un largo y dificultoso viaje en los pasados 14 años pero es asombroso lo muy lejos que hemos llegado. Continuamos siendo una fuerte comunidad que se expande al mundo. Estamos unidos en nuestro esfuerzo y poseemos el ímpetu para acompañar las metas que nos hemos puesto a nosotros mismos. Recordamos diariamente que tenemos un largo camino aún por recorrer para alcanzar esas metas, pero estamos estimulados por nuestros logros y nos energizan nuestros desafíos.

Como siempre, nuestro más sentido agradecimiento a los niños, adultos y familias que viven con FOP cada momento de sus vidas. Su ecuanimidad y nobleza provee la perpetua inspiración que dignifica este trabajo y de todos los que tienen el privilegio de participar en el mismo.

Este año, queremos extender un agradecimiento especial a Jeannie Peeper, la fundadora de IFOPA, quien se ha retirado de la dirección del consejo directivo, pero continuará siendo Presidente, vocera y líder moral de la comunidad FOP. Su visionaria devoción del sostén de la investigación en FOP nos da claridad en nuestra misión y esperanza para las futuras generaciones.

El proyecto colaborativo de investigación en FOP surge de un mutuo deseo de encontrar la causa y establecer la cura para esta discapacitante condición. Los términos *cuidado*, *compasión* y *colaboración* son los aglutinantes que ligan causa y cura. Estamos muy agradecidos a muchos colegas y colaboradores en oficinas médicas, clínicas, hospitales, laboratorios de investigación, centros y universidades alrededor del mundo que sin su ayuda este esfuerzo hubiera sido más difícil, si no imposible. Sin su generosa ayuda y soporte, esto no hubiera sido posible. Juntos alcanzaremos la meta del establecimiento de la causa y encontraremos la cura para esta discapacitante condición y prevaleceremos. Como siempre, el encontrar un tratamiento efectivo para FOP no es un trabajo, es una misión.

Todos nosotros en el Laboratorio central de FOP, en el Programa de Becas de Desarrollo, y en la afiliación de esfuerzos colaborativos alrededor del mundo están extremadamente orgullosos de ser parte de esta misión, y estamos muy agradecidos a aquellos que sostienen este esfuerzo de investigación vital:

- La Asociación Internacional FOP (IFOPA)
- El Instituto Nacional de Salud (El pueblo de Estados Unidos de América)
- El Centro de Investigación en FOP y Desordenes Relacionados

- La Fundación Familia Cali para la Investigación en FOP
- La Fundación Familia Weldon para la Investigación en FOP
- La Cátedra Isaac and Rose Nassau en Medicina Ortopédica Molecular
- La Beca Born-Lotke Zasloff en Medicina Ortopédica Molecular
- La Beca Whitney Weldon - Stephen Roach en Genética Molecular de FOP
- La Beca Roemex en fisiopatología molecular de FOP
- La Beca Grampian en fisiopatología molecular de FOP
- La Asociación Heteroplasia Osea Progresiva
- La Fundación Hartford
- El Consejo de Investigación Médica y la Universidad de Oxford (Reino Unido)
- La Asociación Francesa contra las Miopatías (Francia)
- Miembros del Consorcio Internacional de Investigación en FOP
- Johnson & Johnson, Inc.
- La gente de Santa María (12 años de extraordinarios servicios)
- Y los muchos individuos, familias y amigos a lo largo de todo el mundo que contribuyen tan generosa e incansablemente al esfuerzo de FOP.

Gracias, como siempre, por su continua generosidad y sostén a este vital esfuerzo.