

**DUODECIMO REPORTE ANUAL
DEL PROYECTO DE INVESTIGACION COOPERTIVA
SOBRE FIBRODISPLASIA OSIFICANTE PROGRESIVA (FOP)**

ABRIL, 2003

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

El misterio y el sufrimiento de FOP estan intimamente conectados con la mision de solucionar y curar esta enfermedad. El objetivo de la investigacion en FOP es descubrir la causa molecular y genetica de FOP y utilizar este conocimiento para diseñar instrumentos preventivos, terapeuticos y eventualmente, la cura de la enfermedad. Nosotros continuamos obteniendo progresos significativos para lograr estos objetivos.

Avances importantes en la investigacion relacionada con FOP durante 2002 incluyeron:

1. El descubrimiento de la conducta biologica anormal del receptor BMP en las celulas de FOP.
2. El uso de la tecnologia de micro ordenacion para explorar simultaneamente el perfil de expresion de miles de genes de celulas con FOP y compararlo con celulas control.
3. El uso de experimentos para trazar el pedigree molecular de las celulas para determinar los origenes de algunas de las celulas que participan en la osificacion heterotrofica.
4. El desarrollo de nuevos sistemas de modelaje de la osificacion heterotrofica.
5. El reconocimiento de que el efecto anti-angiogenico de los inhibidores cox-2 y de los nuevos aminobifosfonatos puede ser utilizado racionalmente en ensayos clinicos en FOP.
6. El refinamiento en test preclinicos de investigacion en animales de vectores para la administracion del antagonista "noggin" de la BMP en terapia genetica.

En el presente Reporte Anual discutiremos el progreso en nuestra batalla contra la FOP. Describiremos los descubrimientos en el laboratorio y en la clinica y esbozaremos nuestros planes de investigacion para el año siguiente. Adicionalmente incluiremos la informacion necesaria para describir como el presente trabajo se ubica dentro del plan general para desarrollar instrumentos efectivos de prevencion, tratamiento y curacion de la FOP.

Si bien la mision investigativa en FOP es clara, los descubrimientos investigativos no son metas finales per se, sino avances a lo largo del prolongado viaje que ultimamente culminara en una cura para FOP. La mayoria del trabajo sobre el cual reportamos en nuestro Undecimo Reporte en Abril del año anterior continua en evolucion. Muchos de estos proyectos son tecnicamente complejos y tomara años para su finalizacion. Algunos producen informacion valiosa en forma regular, que puede ser transmitida incrementalmente tan pronto es verificada y revisada por otros investigadores. En otros

proyectos, la informacion emerge en forma subita e inesperada y es siempre excitante descubrir detalles que explican y aclaran problemas, como cualquier persona comprometida en investigacion medica puede atestiguar.

El metodo cientifico de investigacion es un proceso universalmente aceptado como una de las iniciativas mas estructuradas del genero humano. Sin embargo, los descubrimientos cientificos que surgen de tales procesos estructurados son usualmente sorprendentes e inesperados. Estos descubrimientos raramente, si acaso alguna vez, proceden en forma predecible. A veces avanzan lentamente, otras a pasos gigantes que dejan a los investigadores y a la comunidad en general, completamente estupefactos. Raramente, si acaso alguna vez, presentan señales tempranas que permiten predecir tales avances. Ocurren, como cualquier niño tratando de armar un rompecabezas lo reconoceria, como una sensacion inmediata que algo nuevo esta pasando - que piezas que antes parecian totalmente discordantes, empiezan a ordenarse y agruparse en una forma totalmente novedosa. Tal fue el caso el año pasado cuando descubrimos que un tipo particular de celula del tejido musculo-esqueletico estaba transformandose en una celula osea. Mas detalles al respecto posteriormente en este reporte.

Utilizando un modelo animal con ratones de experimentacion, postulamos el año pasado el concepto de que una forma geneticaamente diseñada de la proteina “noggin” puede, a traves de terapia genetica, prevenir exitosamente la induccion de osificacion heterotopica en la proteina morfogenica de hueso 4 (BMP4). Este trabajo continua avanzando y tal enfoque de inhibicion de la proteina BMP4 hiper activa en celulas de FOP provee una gran esperanza para una cura de la enfermedad en el futuro. Un articulo cientifico detallado describiendo este trabajo ha sido sometido a consideracion cientifica para su publicacion.

Creemos que el descubrimiento mas importante este año ocurrio en el campo de la señalizacion molecular y lo enmarcamos como tal pues esperamos nos permita disenar la terapia mas efectiva para el tratamiento de FOP. Eventualmente los tratamientos para FOP seran posibles en la medida en que el conocimiento de eventos basicos los soporte, y tal conocimiento se origina en un entendimiento fundamental de las actividades de las celulas con FOP, sus iniciadores y las vias de señalizacion respectivas.

Actualmente sabemos que algunas celulas de FOP producen exageradamente BMP4 al mismo tiempo que son incapaces de producir suficientes antagonistas de BMP4, “noggin” y “gremlin”. Como lo hemos explicado anteriormente, una situacion similar seria acelerar el automovil a su maxima potencia al mismo tiempo que los frenos de emergencia fallan en su accion. Hemos confirmado durante este año que las celulas con FOP tienen una inhabilidad intrinseca para medir, monitorizar y regular apropiadamente la concentracion de BMP4 en su ambiente. No es unicamente el hecho de que las celulas con FOP producen exageradamente BMP4 o muy poco de los antagonistas de BMP4 (tales como noggin and gremlin), sino que las celulas con FOP son simple y profundamente, incapaces de regular la concentracion molecular de BMP4 en su ambiente. Es como si el conductor del automovil no fuera capaz de decidir que tanto accionar el acelerador del carro para hacer que el auto se mueva hacia adelante en forma apropiada y segura. El

lector causal preguntaria por que es este un descubrimiento tan importante? La razon es que señala desde dos direcciones diferentes hacia la misma region de señalizacion celular – hacia los receptores de BMP4 y sus moleculas asociadas (esencialmente hacia el conductor del auto) - que mide, monitoriza y regula los niveles de BMP4 en los alrededores de la celula.

En 2002 confirmamos que celulas con FOP tienen una abundancia exagerada de una de las proteinas receptoras de BMP4 en la superficie celular y que tales proteinas cuya funcion es regular apropiadamente la concentracion de BMP4 estan fijadas en la posicion de ‘encendido’. Estamos investigando en la actualidad como sucede esto y como la super-abundancia y sobre-actividad de este receptor puede alterar la funcion celular que lleva a la formacion de hueso. De nuevo, mas informacion sobre estos excitantes descubrimientos posteriormente en este reporte.

El presente Reporte Annual se divide en nueve secciones mayores que organizan mas claramente el vasto trabajo y actividad en el centro de FOP y los laboratorios cooperativos. Estas secciones son:

- I. Genes
- II. Mecanismos
- III. Celulas
- IV. Modelos
- V. Agentes iniciadores
- VI. Tratamientos
- VII. Presentaciones, Reuniones, Reportes y Publicaciones
- VIII. Su laboratorio de FOP
- IX. Agradecimientos

Esperamos Ud. encuentre este Reporte Annual interesante, comprometedor y esperanzador. Esa es la actitud con la cual nosotros afrontamos cada dia de nuestro trabajo.

I. GENES

Familias Multigeneracionales y Estudios de Localizacion del Gene de la FOP

La identificacion del gene que (cuando mutado) causa la FOP es la clave para entender FOP a la vez que muchas condiciones comunes del desarrollo esquelético. Las mutaciones responsables de la mayoría de las condiciones geneticas se indentifican trazando patrones de herencia de piezas claves de DNA (llamadas polimorfismos) en grandes familias multigeneracionales. Sinembargo, para FOP no se ha encontrado tal familia grande con muchos individuos afectados en ninguna parte del mundo. Durante el año pasado, sinembargo, nuestro trabajo educativo en FOP esta empezando a cosechar frutos. En el area de identificacion de familias multigeneracionales, dos prolificos descubrimientos ocurrieron en 2002, cada uno de los cuales puede eventualmente beneficiar la busqueda del gene de la FOP. Tales desarrollos fueron el descubrimiento inesperado de dos familias multigeneracionales adicionales – una del Reino Unido

(gracias al trabajo valioso de nuestros colegas y colaboradores, Dr. Roger Smith y Dr. James Triffitt de la Universidad de Oxford) y la otra de los Estados Unidos. Cada una de estas familias ha sido contactada. En una de las familias, todos los miembros relevantes han sido examinados y estamos realizando las investigaciones genéticas y moleculares. En la otra familia, los miembros serán examinados en el futuro cercano y los estudios se iniciarán una vez los individuos autoricen tales estudios. En este momento es imposible determinar si la adición de dos familias multigeneracionales nos permitiría reducir sustancialmente los intervalos genéticos de localización del gen de la FOP y continuar la clonización posicional de tal gen, pero claramente proveerán un acercamiento importante hacia tal objetivo.

Es muy probable existan familias multigeneracionales adicionales pero dichas han tenido muy poco contacto con la comunidad médica. El aumento progresivo de investigación médica en FOP y el trabajo cooperativo internacional creciente entre la red de científicos y médicos con conocimiento suficiente para reconocer y diagnosticar FOP está cambiando este panorama. Adicionalmente, no podemos subestimar el papel del Internet en diseminar nueva información y atraer la atención de médicos, científicos y las familias per se.

Descubrimientos sobre la secuencia de posibles genes

El año pasado reportamos en la identificación de cuatro pequeñas familias adicionales con FOP cuyo DNA podría ser incorporado a los estudios de mapeo genético. Si bien ninguna de estas familias es una familia multigeneracional tradicional, cada una posee características genéticas particulares que nos ayudaron a descifrar claves sobre la localización cromosomal del gen de la FOP. La utilidad de tales estudios para ubicar más detalladamente la ubicación de gen de la FOP es importante y nuevos conocimientos de mapeo genético están actualmente siendo analizados a profundidad. Este análisis ha sugerido cuatro regiones pequeñas en varios cromosomas adicionalmente al cromosoma 4 que pueden ser claves para FOP y estamos profundizando vigorosamente en tales posibilidades. Además continuamos examinando posibles genes tanto dentro como fuera de la región del pedigree, genes que, si mutados, podrían posiblemente causar FOP. Los candidatos incluyen genes que participan en la vía proteica morfogenética de la formación de hueso, genes que controlan el desarrollo esquelético y/o de la médula ósea, y genes que controlan la función inmune y/o la respuesta inflamatoria. A través de nuestros esfuerzos de secuencialización genética hemos excluido muchos genes que eran candidatos de FOP, pero aun quedan muchos más por evaluar. La continuación del trabajo del mapeo del genoma humano en laboratorios alrededor del mundo provee información valiosa para estudiar la relevancia potencial de muchos genes recientemente identificados y la perspectiva de la señalización genética relevante a FOP. Si bien estos esfuerzos de secuencialización genética del DNA de posibles genes comprometidos es laboriosa, es esencial que no dejemos ningún gen potencialmente comprometido con FOP sin ser investigado.

Realizar estos estudios era imposible para nosotros hace algunos años debido a que teníamos muchas regiones para investigar y muy pocos marcadores moleculares con los

cuales realizar búsquedas en regiones de interés particular. Actualmente, sin embargo, tales estudios son posibles y están siendo realizados gracias a la ayuda de nuestro estimado colega y colaborador, Dr. Michael Connor de la Universidad de Glasgow en Escocia.

El proyecto de recombinación mitótica

El año pasado reportamos un enfoque novedoso para encontrar el gen de la FOP llamado el proyecto de recombinación mitótica. Este proyecto, que permite un enfoque genético alternativo que evita la necesidad de obtener muestras de ADN de grandes familias multigeneracionales, podría expandir significativamente nuestra habilidad para identificar la causa genética de enfermedades tales como la FOP para las cuales grandes familias son difíciles de obtener. La idea básica del estudio es simple y novedosa y se basa en capitalizar la reorganización de información genética que ocurre ocasionalmente en las células corporales. El proyecto es utilizar linfocitos de FOP, existentes en nuestro laboratorio en muestras de sangre provistas por nuestros pacientes, para generar “familias de células” que podrían ser usadas para delimitar más precisamente el intervalo genético donde se localiza el gen de la FOP. Uno de los aspectos más llamativos de este trabajo, de acuerdo a la opinión de uno de los analistas del NIH es que “las técnicas a desarrollar en esta propuesta se podrían aplicar a innumerables enfermedades raras para las cuales análisis de pedigrí genético son imposibles”.

Si bien la estrategia de este novedoso proyecto de recombinación mitótica es simple y elegante, la logística y el desarrollo táctico del mismo enfrenta numerosos problemas técnicos. Durante el año pasado hemos dedicado gran parte de nuestra atención a este proyecto intentando sobrepasar muchos obstáculos técnicos. Hemos aprendido significativas lecciones sobre la genética molecular de FOP y sobre la conducta de las células con FOP y tenemos una idea mucho más elaborada sobre las barreras técnicas que debemos vencer. Muchas de las técnicas de laboratorio que hemos venido desarrollando en el año anterior se aplican, no solo a este proyecto, sino a muchos otros proyectos sobre FOP que estamos desarrollando en nuestro laboratorio. Este continúa siendo uno de los proyectos técnicamente más difíciles en nuestro laboratorio que, independientemente de su resultado final, nos otorgará una gran cantidad de conocimientos sobre la conducta de las células con FOP.

II. MECANISMOS

A. Desorden de la regulación esquelética

A diferencia de enfermedades óseas tales como displasia fibrosa, osteogénesis imperfecta o cáncer de hueso, donde el hueso neo-formado es anormal, no existe ninguna anomalía en el hueso adicional en FOP, excepto el hecho que tal hueso no debería ocurrir donde se está formando. FOP no es un desorden de la estructura esquelética o de la composición esquelética, sino de la regulación esquelética.

Las lecciones sobre heteroplasia osea progresiva (POH), la enfermedad hermana de FOP, proveen un contraste importante en la seccion siguiente de este reporte. Para POH, hemos descubierto el gene causante, pero no tenemos idea de los mecanismos que tal gene usa para producir hueso heterotopico (extra-hueso). Para FOP, aun no conocemos el gene causal, pero estamos ganando mas y mas conocimientos sobre los mecanismos de señalizacion que usan las celulas para producir hueso heterotopico. Para ambas condiciones es necesario conocer no solo el gene causal sino los mecanismos reguladores a traves de los cuales ocurre el daño genetico.

El establecimiento de un tratamiento efectivo para un desorden del desarrollo geneticamente-establecido como FOP resultara de la identificacion de la mutacion genetica y del mecanismo de desarrollo disregulado que causa FOP. Para FOP, pedigrees familiares son escasos y clonacion posicional y ordenamiento genetico son dificiles. Una via alternativa para identificar la patologia primaria de FOP consiste en usar estrategias para aislar los mecanismos moleculares disreguladores y desde alli, trazar retrogradamente hacia el gene defectuoso. Durante el año pasado, hemos consagrado muchos esfuerzos a este tipo de estudios, y los resultados estan empezando a beneficiarnos.

En esta seccion de nuestro Reporte Annual describiremos uno de los mayores avances en la investigacion de FOP durante el año anterior: el descubrimiento de la biologia anormal del receptor BMP en las celulas con FOP. Antes de explorar esta nueva avenida de investigacion, seria recomendable revisar algun material basico, descrito previamente en nuestro reporte anual anterior, dado que los avances del presente año se basan directamente en estos conocimientos. Con tal proposito, profundizaremos en las siguientes tres secciones: “Que es un morfogeno?”, “Vias autoregulatorias de retroalimentacion negativa” y “Disregulacion de las vias autoregulatorias de retroalimentacion negativa en celulas de FOP”. A continuacion de tal introduccion, describiremos algunos de nuestros hallazgos mas novedosos y la hipotesis que guia este brazo seminal de nuestros esfuerzos investigativos en FOP.

Que es un morfogeno?

La protenia morfogenica de hueso 4 (BMP4) es una proteina especial conocida como un morfogeno y codificada por un gene que lleva su nombre. BMP4 es una proteina que se conserva muy estable a traves de la evolucion del reino animal y tiene muchas funciones diferentes durante el desarrollo y despues del nacimiento.

BMP4 es un morfogeno. Un morfogeno es una molecula señalizadora secretoria que organiza un campo de celulas a su alrededor para producir un patron especifico. En el caso de la mosca de las frutas (que no tiene huesos), BMP4 organiza los patrones para la planeacion corporal y para otras estructuras como las alas. En el caso del ser humano, BMP4 organiza los patrones celulares de varios organos incluyendo los folículos pilosos, el oido medio y el esqueleto mismo. BMP4 forma un gradiente de concentracion emanando de un grupo localizado de celulas y la proteina BMP4 determina el arreglo y destino de las celulas que responderan de acuerdo a la concentracion de BMP4 que dichas

celulas perciben en el ambiente que las rodea. La idea de un gradiente morfogenico esta intimamente asociada al concepto de informacion posicional. Una celula en el ambiente de la molecula de BMP4 interpreta su posicion en un grandiente de concentracion y determina su desarrollo de acuerdo a tal concentracion.

BMP4 es un morfogeno, no una enzima. Enzimas catalizan reacciones quimicas en el cuerpo. A mayor concentracion de la enzima, mayor reaccion quimica resultante. Asi, por ejemplo, si Ud. tiene el doble de la concentracion de una enzima, el numero de reacciones quimicas resultantes sera dos veces mayor y el producto de tales reacciones sera el doble del origina. Este no es el caso de los morfogenos, tales como el BMP4. Los morfogenos activan diferentes genes a diferentes concentraciones. Por ejemplo, a concentraciones bajas, BMP4 activa una serie de genes, a concentraciones intermedias, activa una serie de genes diferentes y a concentraciones altas, una tercera serie de genes es activada. Esto, claro esta, es una super-simplificacion, pero el concepto de los morfogenos teniendo diferentes efectos a diferentes concentraciones es extremadamente importante y muy relevante a la FOP.

Como entontes, se establecen los gradientes de BMP4 y como se mantienen para permitir al cuerpo crear exactamente lo que necesita, exactamente cuando lo necesita y precisamente donde lo necesita y absolutamente en ninguna otra parte?

Vias autoreguladoras de retroalimentacion negativa

El concepto de vias autoreguladoras de retroalimentacion negativa es central para entender la idea de gradientes de morfogenos y la extraordinaria precision de su control. Durante los pasados cinco años, hemos identificado y elucidado numerosos pasos en la transmision molecular de los morfogenos secretados para regular el control genetico a nivel molecular (como el BMP4). A cada paso de esta transmision molecular, desde la secrecion del morfogeno hasta los efectos del mismo en las celulas blanco, la naturaleza le ha agregado un mecanismo de retroalimentacion negativa. Estos mecanismos constituyen un grupo de frenos altamente regulados que determinan la concentracion de moleculas intermediarias en la via de la accion del morfogeno y trabajan juntos como un sistema de guia molecular para el funcionamiento apropiado de dicha via de accion.

Los mecanismos de retroalimentacion negativa permiten a las ceulas operar con gran precision dentro de un rango extremadamente angosto que ocasiona que el gradiente del morfogeno nunca fluctue en exceso de la concentracion precisa para actuar en un tejido de interes particular. Estos mecanismos son necesarios para el funcionamiento apropiado de los grandientes del morfogeno y su explicacion es esencial para entender el funcionamiento de tales gradientes.

La presencia de vias de autoregulacion negativa en los circuitos geneticos provee una gran estabilidad, limtando el rango de fluctuacion de la concentracion de los componentes de una red molecular. La estabilidad de una via morfogenetica mediada por autoregulacion es mucho mas superior que la de una via no regulada. Los mecanismos de autoregulacion negativa han sido indentificados en cada paso de la via de accion del

BMP4.

Disregulacion de los meacnismos de autoregulacion negativa en FOP

Con base en los conceptos previamente expuestos, sera mas facil entender uno de los mas importantes descubrimientos cientificos de nuestro laboratorio en los pasados años – el hallazgo de que las celulas con FOP son incapaces de regular apropiadamente la via de la BMP4 en respuesta a señales de BMP4. La falla de las celulas FOP para incrementar apropiadamente la expresion de antagonistas de BMP4 secretados en respuesta a una señal de BMP4 sugiere una posible perdida de la autoregulacion negativa que causa que la expresion de niveles de BMP4 y, consecuentemente, la accion de BMP4, sea marcadamente elevada y sostenida en FOP.

La osificacion heterotopica en FOP empieza en la niñez, y puede ser inducida por trauma quirurgico, trauma de tejidos blandos, inmunizaciones intramusculares o inyecciones para procedimientos dentales. BMP4 es producido por el musculo esqueletico y su expresion se incrementa en sitios de lesion de tejidos blandos. En circunstancias normales, BMP4 estimula dramaticamente la expresion de varios antagonistas de BMP4. La falla de la respuesta antagonista a BMP4 secretado en respuesta a trauma de tejidos blandos permitiria una expansion rapida de la señal de BMP4 que conduce a formacion progresiva de hueso. El crecimiento de tejido fibroproliferativo preoseo altamente vascularizado que se produce localmente en respuesta a superexpresion de BMP4 podria magnificarse en presencia de una repuesta antagonista fallida lo que podria explicar la induccion explosiva de hueso que se ve durante exacerbaciones de FOP. Estos hallazgos ilustran la importancia de un balance critico entre un morfogeno inductivo (BMP4) y la secrecion de sus antagonistas en la formacion de systemas de organos ectopicos y sugieren un potencial para desarrollar estrategias basadas en antagonistas de BMP4 para el tratamiento de FOP.

Ademas, las celulas de FOP tienen un defecto intrinseco en su habilidad para regular niveles de BMP4 en un amplio rango de eventos metabolicos y del ciclo celular in vitro. En celulas normales, los niveles de BMP4 se mantienen cuidadosamente regulados a traves de todas las fases del ciclo celular, mientras que en FOP las concentraciones de BMP4 varian dramaticamente. La inhabilidad de las celulas de FOP de regular apropiadamente las concentraciones de BMP4 a traves del ciclo celular puede reflejar un defecto basico en la regulacion de la via de BMP4. La accion primaria de un gene defectuoso en la via de BMP4 podria afectar uno o mas componentes de esta via, como un guarda quien tiene a su cargo controlar varios puntos de chequeo. Alternativamente, un gene defectuoso que afecta solo un aspecto de la via de BMP4 podria tener repercusiones secundarias que son mas generalizadas. Esto sugiere que en celulas con FOP los genes que sintetizan proteinas que regulan BMP4, receptores de BMP4 y tal vez proteinas que degradan BMP4 o sus receptores geneticos son disfuncionales.

Dysregulacion de la via de BMP4 en FOP

Para comprobar la hipotesis que la via de BMP4 esta anormalmente regulada en FOP,

nosotros realizamos un examen detallado de los varios mecanismos de retroalimentacion de autoregulacion negativa de la via de la BMP4 en celulas de FOP y encontramos defectos en multiples sitios. Tales defectos incluyen no solo la superexpresion del ARN mensajero de BMP4 y su proteina y la inhabilidad de incrementar la secrecion de multiples antagonistas de BMP4, sino la superexpresion y la activacion de proteinas receptoras de BMP4 en la superficie celular. Estos hallazgos han sido documentados en numerosas lineas celulares de FOP y proveen evidencia significativa que la via de BMP4 esta intrinsecamente disregulada en FOP. Este trabajo es actualmente foco de investigacion intensa en el laboratorio de FOP. La primera parte de este trabajo es el objeto de una publicacion cientifica importante, actualmente en prensa en la Revista de Cirugia de Huesos y Articulaciones (**The Journal of Bone & Joint Surgery, JBJS**).

La revision del articulo a publicarse en JBJS menciona: ‘Este es un articulo extremadamente interesante, bien estructurado e importante que provee evidencia del papel de proteinas morfogenicas de hueso en la patogenesis (causa) de FOP. Si bien informes anteriores han comprobado que la superexpresion de esta proteina es causa esencial en FOP, la posibilidad de un daño en la via de control regulatoria de la secrecion de proteinas antagonistas como parte de la causa de esta enfermedad es potencialmente reveladora e importante. La habilidad del laboratorio de FOP para obtener muestras suficientes de celulas linfoblastoides de pacientes afligidos con esta rara enfermedad hace de este reporte una oportunidad unica y valiosa para aprender una gran cantidad de informacion novedosa. El concepto de que la funcion de BMP en humanos esta regulada en forma muy precisa por la interaccion entre BMP-receptores del morfogeno BMP y sus antagonistas ciertamente genera interrogantes en relacion al uso terapeutico potencial de tales conocimientos en cirugia ortopedica. Tal perspectiva, en adiccion a los hallazgos de este informe constituyen una contribucion importante al papel de las proteinas osteoinductivas en enfermedad y su tratamiento’.

Los Receptores de BMP en FOP: Unos Aumentados, Unos Disminuidos – Las Bases para una Teoria Unificada

Como hemos descrito, las vias de señalizacion de BMP4 estan disreguladas en las celulas de pacientes con FOP. Estudios recientes sugieren que estas celulas fallan en regular apropiadamente concentraciones ambientales de BMP4 y fallan en regular apropiadamente la transcripcion de los productos finales de los genes de BMP4 tales como los antagonistas de BMP4. Datos preliminares (2002) indican que uno de los receptores de BMP esta presente en altos niveles en la superficie de celulas con FOP mientras otro de los receptores se encuentra en concentraciones muy bajas. Estos datos son consistentes con estudios de desarrollo que muestran que la superexpresion postnatal de uno de los receptores de BMP (el que es superabundante) puede causar osificacion heterotopica y que la subexpresion embrionica del otro receptor de BMP (el que esta subexpresado en las celulas de FOP) puede causar malformaciones del dedo gordo del pie que son casi identicas a aquellas presentes en pacientes con FOP. No existen mutaciones en las secuencias codificantes de BMP4, de los multiples antagonistas de BMP4 o de los receptores de BMP en los pacientes con FOP. Estos datos en conjunto sugieren entonces que existe un defecto primario en la via de señalizacion de BMP4 en celulas con FOP y

que uno de los receptores de BMP puede estar constitucionalmente activo y no responder a señales normales en las células con FOP.

Las células derivadas de pacientes con FOP ofrecen una oportunidad única para entender el papel que juega la alteración de la señalización del receptor de BMP en la inducción de la formación de hueso endocondral tal como ocurre ectópicamente en pacientes con FOP. Esto condujo a plantear nuestra hipótesis actual que postula que la señalización anormal en FOP es el resultado de cantidades aumentadas de uno de los receptores de BMP en la superficie celular y media la formación extra de hueso mientras que las malformaciones del dedo gordo del pie resultan de cantidades recíprocamente disminuidas y/o de la actividad de otro receptor de BMP en la superficie celular.

El análisis de la patología molecular de la actividad del receptor de BMP en la superficie de células con FOP está empezando a producir información crítica sobre los mecanismos moleculares que conducen a los eventos tempranos en la patogénesis de FOP. El entendimiento fundamental de la regulación molecular y genética de las vías de BMP en células con FOP conducirá a un enfoque terapéutico más racional de FOP así como de una variedad de trastornos que producen la inducción de formación de hueso en el ser humano.

Cual es la via a seguir?

La descripción estándar de una vía de señalización celular es más o menos la siguiente: un morfógeno (tal como BMP4) es producido y secretado por una célula y se fija a un receptor de la membrana celular causando activación (fosforilación) del receptor. La activación del receptor produce una cascada de eventos dentro de la célula que activa o reprime genes blanco que produzcan eventos tales como la formación de hueso.

Uno de los mayores misterios en biología lo constituye la manera tan sensible y específica como las células regulan los eventos blanco en la cascada de activación/represión. La vía de BMP está constituida por múltiples morfógenos, múltiples receptores y múltiples moléculas intermediarias. Hasta hace poco, se creía existe solo una vía mayor a través de la cual BMP regula eventos blanco subsecuentes. Durante el año anterior se han producido estudios de diferentes laboratorios, incluyendo el nuestro, que muestran que existen por lo menos dos (y tal vez tres) vías coordinadas (o alternas) a través de las cuales la señal de BMP regula eventos blanco subsecuentes.

Durante la década pasada se creía que BMP afecta los eventos blanco subsecuentes a través de la vía canónica de SMAD. Durante el año anterior, hemos descubierto que una vía coordinada o alterna conocida como la vía de la proteína-quinasa activada del mitógeno p38 (MAPK), juega papel importante en células con FOP. Si bien el significado exacto de este hallazgo es desconocido hasta el momento, es claro que lo más que sepamos sobre las vías a través de las cuales BMP4 señala sus eventos blanco subsecuentes, lo mejor preparados estaremos para diseñar estrategias terapéuticas para interrumpir y corregir cualquier desbalance molecular de estas vías.

Estamos muy entusiastas con nuestros progresos investigativos en esta area de señalización molecular (también conocida como transducción de señales) en células con FOP, y estamos seguros habrá descubrimientos aún más excitantes en esta area en el año porvenir. Les mantendremos informados tan pronto tales eventos se desarrollen y confirmen.

Estudios de microensayos de expresión genética a gran escala

Comparar el patrón de expresión de múltiples genes en la vía de BMP4 y otras vías relacionadas entre células con FOP y células sin FOP constituye un enfoque extremadamente importante para decifrar el diagrama de funcionamiento de las células con FOP. Hemos explicado en reportes previos que la investigación en FOP es muy parecida a tratar de decifrar los diagramas de los mecanismos de una bomba atómica producida por un ‘terrorista molecular’ (el gen mutado de FOP). Un análisis más completo de los patrones de expresión genética en células con FOP nos permitirá determinar mecanismos relevantes de la vía de BMP4 y diseñar mecanismos para desactivar la bomba en forma más rápida y precisa.

Dos recientes desarrollos tecnológicos revolucionarios han provisto las herramientas necesarias para profundizar el entendimiento de los misterios del genoma humano, y han permitido abrir nuevas avenidas, más productivas, para entender las bases moleculares de las enfermedades genéticas. Estos desarrollos son muy importantes para nuestra investigación en FOP e incluyen:

- * microensayos de expresión genética a gran escala
- * análisis computadorizados de alta velocidad de bases de datos comparativas de genomas

Tecnología de microensayos en AND producida recientemente nos permite monitorizar miles de genes simultáneamente y constituye un avance tecnológico mayor que está empezando a proveer información sin precedentes sobre la expresión genética en FOP.

Microensayos de expresión genética a gran escala, y el poder del computador y de programas para computador necesarios para analizar la extraordinaria multitud de datos generados por tal tecnología nos permite explotar el tesoro de información sobre el genoma humano para poder entender mejor las vías genéticas defectuosas en FOP. Microensayos de expresión genética a gran escala de patrones genéticos en FOP requieren el uso de centros especializados y computadores de tal capacidad que se escapan a nuestro laboratorio de FOP. Tales facilidades, sin embargo, existen actualmente en la Universidad de Pensilvania, y están al alcance y dispuestas a trabajar con nuestro laboratorio.

Con la ayuda del recientemente establecido Fondo de Investigación en FOP de la familia Weldon, hemos iniciado este nuevo y excitante programa. Durante el año pasado se estableció en la Universidad de Pensilvania un centro totalmente actualizado para microensayos genéticos, lo que ha constituido una tremenda adición para el diseño y culminación de estudios en FOP. Hemos iniciado un programa de estudios usando líneas

de células con FOP y células control y nuestro trabajo se ha expandido recientemente con la producción de dos grupos de datos experimentales que pueden ser comparados para buscar similitudes y diferencias. Actualmente estamos analizando el primero de tales grupos de datos comparando muestras con FOP y controles y estamos en el proceso de conducir experimentos suplementarios.

Una estrategia experimental adicional constituye la comparación de muestras individuales de ARN de miembros afectados y sanos de una misma familia con herencia de FOP. Debido a que los individuos que proveen las muestras usadas en estos experimentos están relacionados, esperamos que la variación inherente de la expresión de ARN sea baja (a comparación con la expresión de ARN en miembros de la población general). Estos datos nos permitirán comparar individuos con FOP con personas de su misma familia y con personas no afectadas en varias combinaciones.

Los experimentos de microensayos generan una gran cantidad de datos con múltiples variables que requieren evaluaciones asistidas por computador para identificar similitudes o diferencias entre series comparadas. Actualmente estamos conduciendo análisis estadísticos en nuestras series de datos con la colaboración del Dr. David Rocke, Profesor de Estadística de la Universidad de California en Irvine.

Un análisis preliminar de nuestra serie de datos ha revelado varias diferencias potencialmente interesantes entre células FOP y control, y estamos actualmente verificando el significado de tales diferencias. Además, estos estudios proveen la fundación de análisis exploratorios más completos que generarán la base para continuar nuestras investigaciones en esta área extremadamente importante de investigación en FOP.

Vías de interacción de BMP

Por las razones discutidas anteriormente, la mayoría de nuestra investigación se ha centrado en la vía de señalización de la BMP4 en FOP. Sin embargo, es posible que otras señales de vías de transducción estén comprometidas en el proceso de FOP. Casi todas las investigaciones en biología del desarrollo relacionadas con el estudio de FOP revelan que al menos cinco vías de transducción cuyas señales están inter-relacionadas están comprometidas en FOP. Estas incluyen la vía de señalización de BMP, la vía de señalización del herizo (HH), la vía de señalización WNT, la vía de señalización NOTCH y la vía de señalización del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF). Cada una de las cuatro últimas tiene interacciones críticas con la vía de señalización de la FOP y estamos investigando estas interacciones en su relación con FOP.

Si bien no hemos encontrado hasta la fecha ninguna patología primaria en las vías de señalización HH, WNT o NOTCH, nuestro descubrimiento de que el factor 2 básico de crecimiento del fibroblasto (FGF2) está superexpresado en lesiones de FOP ha generado varios esfuerzos de colaboración investigativa que están en camino actualmente.

En uno de tales proyectos de colaboración investigativa financiado por el Programa de

Fondos Investigativos del Centro para Investigacion en FOP y Enfermedades Relacionadas, la Dra. Hyun Duck Nah, Profesora Asociada de Investigacion en el Departamento de Bioquimica de la Universidad de Medicina Dental en Pensilvania, esta investigando las interacciones de señalizacion entre FGF2 y BMP4 en la osificacion endocondral como un mecanismo patogenico potencial en FOP. Interesantemente, sus datos preliminares muestran que FGF2 aumenta significativamente la expresion genetica de BMP4 tanto en celulas precursoras de cartilago como en celulas cartilaginosas diferenciadas. Esto ha llevado a la hipotesis que FGF2 es un regulador positivo transcripcional del gene de BMP4 y que la señalizacion integrada de FGF y BMP juega papel fundamental en la osificacion endocondral. Actualmete la Dra. Nah esta investigando el papel potencial de señalizacion integrada FGF y BMP en osificacion endocondral y el papel de la señalizacion FGF en la activacion de la transcripcion del gene BMP4 en celulas cartilaginosas para tratar de identificar la region del promotor de BMP4 (la secuencia del gene regulador de ADN) que confiere la capacidad de responder a FGF2.

En resumen, estos estudios estan contribuyendo a definir cuidadosamente las interacciones entre señalizaciones de FGF y BMP en osificacion endocondral, el tipo de formacion de hueso que ocurre en la formacion normal del esqueleto, la cicatrizacion de fracturas y la FOP. Estos estudios han generado nuevos conocimientos sobre los mecanismos potenciales de la formacion de lesiones tempranas de FOP y han contribuido a nuestra proposicion sobre la utilidad de agentes anti-angiogenicos en la modulacion de las interacciones entre estas vias para controlar el crecimiento de lesiones en FOP.

FOS Y FOP: Lecciones imporantes de un paciente con FOP

Recientemente hemos re-dirigido nuestra atencion a un trabajo que presentamos hace varios años, demostrando que la superexpresion embrionica del gene FOS en el raton produce formacion heterotopica postnatal de cartilago y hueso con caracteristicas clinicas similares a aquellas presentes en niños con FOP. FOS es una proteina señalizadora importante que trabaja dentro del nucleo de las celulas y tiene importantes funciones en activar y desactivar genes en casi cualquier celula del organismo. Curiosamente, sinembargo, la superexpresion o subexpresion de FOS parece tener efectos particularmente marcados en celulas oseas y musculares respectivamente. La superexpresion de FOS durante el desarrollo embrionario del raton produce formacion heterotopica de hueso al menos enparte a traves de una via de transduccion de señalizacion mediada por BMP4.

Inicialmente dirigimos nuestra atencion a la familia de genes FOS/JUN debido a su papel en el desarrollo de huesos y cartilagos. FOS esta presente a niveles extremadamente altos en la mayoria de los osteosarcomas humanos (canceres de hueso) y se identifico inicialmente por su habilidad en inducir tumores oseos en roedores. Ademias, expresion aumentada de la proteina FOS se encuentra en huesos de pacientes con displasia fibrosa, una condicion cuyo nombre suena similar a FOP, pero que es muy diferente. Los huesos afectados por displasia fibrosa tienen una maduracion incompleta de sus celulas

formadoras de hueso y tienen una apariencia radiológica de lesiones expansibles de tipo ‘burbujas de jabón’. Estos huesos son a menudo extremadamente dolorosos y se fracturan fácilmente.

Las mutaciones genéticas que causan displasia fibrosa no se transmiten de una generación a la otra a través de las células germinales (espermatozoides y ovulos), sino que surgen espontáneamente durante la embriogénesis temprana y afectan las células de uno o más huesos en el organismo. Ironicamente, el gen responsable de la displasia fibrosa es el *GNAS1*, el mismo gen que causa POH, la enfermedad hermana de FOP! Sin embargo, en displasia fibrosa el gen está superactivo mientras que en POH está subactivo.

Para hacer la historia aún más interesante, previamente habíamos tenido contacto con una mujer mayor quien presentaba signos clínicos clásicos de FOP y de una severa displasia fibrosa. Si bien una conexión inmediata entre las dos entidades no es obvia, nos llamó la atención como un hecho extremadamente interesante e inusual el que un mismo individuo tuviese dos condiciones raras que afectan el esqueleto, y que ambas tengan conexiones con FOS! Para resumir:

1. Cuando FOS está superexpresado en los huesos, ratones y humanos desarrollan lesiones óseas que semejan displasia fibrosa.
2. Cuando FOS está superexpresado en los músculos, los ratones desarrollan lesiones que parecen FOP.
3. Ratones que superexpresan FOS en sus músculos, superexpresan *MBP4*.
4. Humanos con FOP tienen una cantidad exagerada de *BMP4*.
5. Un paciente tiene características tanto de displasia fibrosa como de FOP.

Que significa todo esto? Si bien nosotros tenemos fuertes dudas sobre el hecho de que el gen FOS es la causa de FOP, es muy probable que FOS esté relacionado con la vía de *BMP4* y que la superexpresión de FOS pueda tener algún papel en el desarrollo de FOP.

Aunque aún es muy temprano para determinar el significado molecular exacto de la ocurrencia de FOP y displasia fibrosa en el mismo individuo, no es muy temprano para dirigir nuestra atención a pistas potencialmente muy importantes. Hemos iniciado un trabajo en 2003 que investigara estas relaciones y sus vías moleculares. Fue, de hecho, una pista semejante en un paciente singular la que nos llevó a decifrar la causa genética exacta de la POH. Si esta pista eventualmente probara ser útil o conducirnos a una calle sin salida resta por determinar.

William Harvey, el médico quien descubrió la circulación sanguínea en los 1600, sin duda uno de los más importantes descubrimientos en la historia de la medicina, escribió: ‘La mayor posibilidad de descubrir los misteriosos secretos de la naturaleza ocurre en aquellos casos cuyas manifestaciones son las más diferentes y lejanas a las formas más comunes en que se manifiesta la naturaleza’. En un comentario similar, Sir William Osler, un famoso médico del siglo 19 dijo: ‘Las clínicas son laboratorios; los laboratorios pertenecen a un orden mayor’. Muy frecuentemente es a través de una pista clínica que se originan cambios en las investigaciones en el laboratorio y muchas veces estas pistas apuntan en direcciones excitantes e inesperadas.

III. CELULAS

Perspectivas sobre la identidad de las células blanco en FOP

Una parte importante del rompecabezas de la FOP que es necesario resolver para prevenir efectivamente complicaciones de esta enfermedad es la identificación de las células blanco comprometidas en la formación de hueso heterotópico. Es esencial no solamente determinar que moléculas activan la vía de BMP4 en FOP, sino también que células reciben y procesan el mensaje que conlleva a la formación de hueso heterotópico. Definir el origen de las células lesionadas en FOP representaría un descubrimiento mayor en la investigación de FOP ya que permitiría establecer puntos de acción y estrategias precisas para intervenciones terapéuticas. Conocer la identidad de las células que se convierten incorrectamente en células formadoras de hueso durante el proceso de osificación heterotópica será un componente importante en el desarrollo de tratamientos y terapias no solo para FOP sino para una plétora de desórdenes comunes de osificación heterotópica así como para la “enfermedad hermana” de FOP, la heteroplasia ósea progresiva (POH). Durante el año pasado, nuestros estudios para examinar los orígenes celulares de cartilago heterotópico y formación de hueso han avanzado dramáticamente produciendo resultados definitivos y sorprendentes.

El Programa de Becas del Desarrollo del Centro para Investigación en FOP y Desórdenes Relacionados establecido por el Fondo de Investigación de la Familia Cali, ha provisto los fondos para el trabajo colaborativo con el Dr. David Goldhamer durante varios años que busca identificar las células que responden en lesiones FOP. Este trabajo, que será explicado a continuación, representa un descubrimiento mayor en investigación en FOP ya que está empezando a identificar puntos de acción para intervenciones terapéuticas. Pero antes, revisemos alguna información básica.

El foco original de este trabajo fue estudiar si las células satélite del sistema muscular esquelético (las células madre adultas que regeneran músculo lesionado) son los precursores del hueso heterotópico inducido por BMP4. El interés de definir esta cuestión se basó en dos observaciones: 1. Las lesiones de FOP ocurren más frecuentemente en tejido muscular esquelético, 2. Bajo ciertas condiciones de cultivo celular, células musculares exhiben características de las células óseas. Dos otros tipos celulares del tejido muscular esquelético – las células perivasculares (células de músculo liso que rodean pequeños vasos sanguíneos) y células endoteliales (células que forman la parte interior de las paredes de los vasos sanguíneos) – han emergido como posibles contribuyentes a la formación de hueso heterotópico. Ambos tipos celulares se encuentran en lesiones tempranas de FOP y ambos tipos celulares exhiben características de formación de hueso en otras situaciones. Consecuentemente, la visión experimental del trabajo original se expandió para permitir la inclusión de estas dos células adicionales. Estos experimentos usan técnicas sofisticadas para trazar la genealogía molecular celular en ratones para investigar el destino de células satélites, células de músculo liso y células endoteliales después de estimular la formación heterotópica de hueso con proteína humana recombinada de BMP4.

Hasta fecha reciente, los experimentos para trazar genealogía celular eran técnicamente

imposibles debido a la incapacidad de marcar en forma estable poblaciones celulares específicas. Este inconveniente técnico fue solucionado con métodos que permiten la marcación permanente basada genéticamente de células específicas usando un sistema sofisticado de marcación genética llamado el sistema de recombinación Cre-Lox. El requisito fundamental de este sistema es el desarrollo de ratones transgénicos que expresan específicamente una enzima llamada Cre-Recombinasa en la célula (por ejemplo, en células satélites, de músculo liso y endoteliales). Cruzando ratones Cre-Lox con una cepa de ratones marcados (la cepa Rosa-26) resulta en la expresión estable del marcador genético exclusivamente en células en las cuales la enzima Cre está presente (lo que causa que estas células genéticamente-marcadas tengan un color azul cuando se exponen a una enzima particular).

Hemos demostrado previamente que la inyección de BMP4 al músculo del ratón causa formación heterotópica de hueso que es histológicamente idéntica a la que ocurre en lesiones de FOP. Inyectando BMP4 en músculos de ratones cuyas células satélites, perivasculares y endoteliales están marcadas genéticamente podremos determinar tanto la presencia como la magnitud de la contribución de cada tipo celular a la formación heterotópica de hueso.

La primera parte del estudio que se completó el año anterior identificó dos poblaciones celulares precursoras que contribuyen a la formación de cartílago y hueso heterotópicos inducida por BMP4. Los resultados con los ratones transgénicos MyoD-Cre (que tienen las células satélite marcadas –las células que regeneran músculo después de una lesión) mostraron participación de las células satélite en la osificación heterotópica inducida consistente con su potencial osteogénico previamente identificado, aunque no parecieron ser las células mayormente comprometidas en tal proceso.

Una contribución numéricamente más significativa a la formación heterotópica de cartílago y hueso se observó con las células marcadas por expresión del gen Tie-2 (de los ratones Tie-2-Cre). Aunque las células progenitoras de células sanguíneas expresan el Tie-2, experimentos con trasplantes de médula ósea permitieron descartar una contribución directa de la médula ósea en la inducción heterotópica de cartílago o hueso por la BMP4 en lesiones tempranas. La fuente más probable de tales células Tie-2 son, consecuentemente, las células endoteliales (vasos sanguíneos) de la vasculatura local del músculo esquelético o células madre Tie-2 residentes en el tejido muscular.

Experimentos con miosina de cadena pesada del músculo liso de ratones Cre en los cuales la enzima Cre-recombinasa se expresa exclusivamente en músculo liso, mostraron que las células cartilaginosas en los implantes de BMP4 no expresaban la marcación genética. Estos datos excluyen células de músculo liso maduras como progenitoras de osificación heterotópica inducida por BMP4 en este modelo. Este resultado fue en cierta forma inesperado ya que las células de músculo liso expresan marcadores osteogénicos en cultivos celulares y ocurren con alta frecuencia entre las células fibroproliferativas en lesiones de FOP.

Estos datos, en conjunto con aquellos de las lesiones propias de FOP, sugieren que las

celulas de lesiones de FOP probablemente no se derivan de la familia del musculo liso, sino que mas bien expresan marcadores de musculo liso durante su diferenciacion hacia cartilago y hueso. Sin embargo, a pesar de sus similitudes con FOP, es importante recordar que el modelo de induccion de BMP4 para FOP puede diferenciar criticamente en muchas formas de las lesiones actuales de FOP, aunque la interpretacion antes mencionada parece ser la mas correcta.

Los resultados de estos experimentos demuestran la plasticidad increible e inesperada de las celulas madres derivadas del musculo y de la vasculatura local en la evolucion de las lesiones de FOP y su habilidad para expresar varios marcadores durante su transformacion hacia el fenotipo de cartilago y hueso.

Como consecuencia, un proyecto importante y nuevo en biologia celular ha producido informacion extraordinaria sobre el origen de las celulas en lesiones tipo FOP inducidas por BMP. Nuestra investigacion ha identificado al menos dos fuentes de celulas progenitoras que contribuyen a la formacion de hueso heterotopico en ratones. Una contribucion menor se observo de celulas presumiblemente musculares satelites que expresan MyoD durante algun momento en su desarrollo celular. Nuestra investigacion continua para averiguar si estas celulas precursoras representan celulas satelite quiescentes o activadas y si la poblacion de celulas madre residentes que expresan el transgene MyoD-Cre es responsable. Una contribucion mas significativa es ejercida por celulas que expresan Tie-2.

Las celulas endoteliales representan la mayoria de las celulas residentes en musculo esquelético que son positivas para Tie-2. Nuestra actual hipotesis de trabajo es que celulas endoteliales maduras positivas para Tie-2 de musculo esquelético, en presencia de abundante BMPs, sufren una conversion fenotipica a celulas cartilaginosas y oseas. Experimentos actualmente en realizacion investigaran la identidad precisa de tales precursores positivos Tie-2 y el mecanismo por el cual marcadores vasculares se expresan durante la evolucion de lesiones tipo-FOP inducidas por BMP.

En resumen, hemos encontrado que lesiones inducidas por BMP contienen contribuciones celulares de celulas musculares satelite asi como de celulas endoteliales residentes dentro del musculo esquelético. Estos hallazgos, en conjunto con los del trabajo colaborativo de Catharine Shanahan de la Universidad de Cambridge, muestran que lesiones de FOP expresan marcadores de musculoliso durante el curso de su evolucion, aunque es poco probable que las celulas cartilaginosas y oseas de las lesiones de FOP se originen en celulas musculares lisas. Mas aun, nuestros experimentos para trazar la genealogia celular indican que poblaciones celulares adiconales contribuyen a las celulas fibroproliferativas, cartilaginosas y oseas en lesiones evolutivas tipo FOP. El origen de tales celulas es actualmente indeterminado, pero otras poblaciones de precursores y celulas madre estan siendo investigadas usando la tecnica de trazo genealogico Cre/lox que ha sido tan exitosa en nuestras manos hasta la fecha. Parece conducente afirmar que una tecnologia de trazo genealogico celular molecular extremadamente poderosa ha sido desarrollada y refinada por el laboratorio de FOP y sus colaboradores para determinar el origen definitivo de las celulas en lesiones tipo FOP inducidas por BMP.

Los resultados de estos estudios de trazo genealogico celular (en colaboracion con el laboratorio Goldhamer de la Universidad de Pensilvania) y los resultados de los estudios de celulas de lesiones de FOP (en colaboracin con el laboratorio Shanahan de la Universidad de Cambridge) sugieren poderosamente que las lesiones celulares tempranas se originan en los vasos sanguineos dentro del musculo esqueletico. Una publicacion cientifica detallada describiendo los hallazgos del estudio Shanahan ha sido sometida a consideracion para publicacion en una revista de investigacion medica acreditada. Los resultados de los estudios de Goldhamer estan actualmente siendo preparados para su publicacion.

El papel de la Vasculatura en la Osificacion Endocondral: Revelaciones de la Biologia del Desarrollo

Un proyecto de los Fondos de Desarrollo imporante y relacionado esta siendo realizado por el laboratorio Pacifici de la Universidad de Pensilvania, utilizando un enfoque de biologia del desarrollo para estudiar el papel de celulas endoteliales (celulas de los vasos sanguineos) en la formacion del esqueleto normal. El objeto a largo plazo de este proyecto es entender el papel de los vasos sanguineos en la iniciacion, progresion y culminacion de la formacion de hueso. Se ha establecido ampliamente que la presencia de vasos sanguineos es requisito para el reemplazo de cartilago por hueso durante tanto las vidas fetal como postnatal. Vasos sanguineos son tambien necesarios para la reparacion de fracturas asi como para la formacion ectopica de hueso. Sinembargo, varias lineas de evidencia sugieren que los vasos sanguineos pueden tener roles adicionales y previamente insospechados en etapas tempranas de la formacion del esqueleto y la osificacion heterotopica. Para probar estas hipotesis, el laboratorio Pacifici ha realizado dos grupos de estudios:

En el primer estudio la pregunta fue si la inhibicion experimental de la angiogenesis (formacion de nuevos vasos) en y al rededor de elementos de musculo esqueletico en desarrollo causaria inhibicion del desarrollo de hueso. Para responder esta pregunta los investigadores usaron embiones de pollo en desarrollo. En el sistema experimental del embion de pollo la esqueletogenesis de las extremidades puede ser monitorizada y manipulada mientras el embion esta aun en el huevo, y el producto de tal manipulacion y los mecanismos de regulacion pueden ser estudiados convenientemente. Escualamina, un esteroide aislado del tiburon (y demostrado como un potente inhibidor de la angiogenesis en otros sistemas) se utilizo para bloquear angiogenesis.

Usando procedimientos de microcirugia, los investigadores colocaron particulas control y particulas embebidas en varias dosis de escualamina cerca del muñon temprano de la extremidad del pollo. En los animales control, cartilago inmaduro aparece en la forma esperada y lentamente se transforma en hueso a traves de un proceso endocondral. En contraste drastico, las extremidades de los embriones a los cuales se les implanto la escualamina fueron mucho mas pequeñas y constituidas casi enteramente por cartilago. Una inspeccion cercada revelo que en los especimenes tratados con escualamina las

celulas de cartilago fueron incapaces de alcanzar estados de desarrollo predecibles y, consecuentemente, la invasion de tales por celulas precursoras de medula osea y vasculares fue severamente deficiente. Sin embargo, el hallazgo mas llamativo fue la falta de invasion de vasos sanguineos en los elementos esqueléticos tempranos y la inhibición dramática resultante de la formación de hueso.

El segundo estudio se centró en una etapa mas temprana de la esquelétogenesis llamada condensación mesenquimatosa (el estado análogo a las lesiones tempranas fibroproliferativas de FOP antes de su transformación a cartilago o hueso). Estas estructuras de alta densidad celular se originan en intervalos específicos de tiempo en el embrión de pollo y representan elementos esqueléticos futuros, tales como el hueso del brazo, de la pierna, o una costilla, por ejemplo. Se sabe de tiempo atrás que la formación de condensaciones mesenquimatosas es precedida por la desaparición de vasos sanguíneos.

Para probar si la remoción de vasos sanguíneos es necesaria para la condensación y esquelétogenesis, los experimentos usaron una evaluación de tipo ganancia de funciones. Partículas conteniendo factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un potente agente angiogénico (promotor de la formación de vasos sanguíneos) fueron colocadas en la proximidad de futuras condensaciones esqueléticas en embriones tempranos de pollo. Con el tiempo, análisis angiogénicos mostraron que el VEGF, como era de esperarse, produjo un gran aumento de la vasculatura local. Este aumento en la vasculatura se acompañó de ausencia de condensaciones mesenquimatosas y de formación de cartilago. A consecuencia, en estados tempranos de la formación esquelética, la invasión vascular paradójicamente inhibe el crecimiento de elementos esqueléticos tempranos.

En conclusión, los resultados de este proyecto proveen evidencia extremadamente importante sobre las relaciones entre el desarrollo esquelético y el desarrollo vascular e identifica factores que pueden mediar tales interacciones. En conjunto con los hallazgos de los laboratorios de Goldhamer y Shanahan, los datos del laboratorio Pacifici agregan a nuestros conocimientos la importancia de la vasculatura (y del control del desarrollo vascular) en la formación de lesiones tipo-FOP. Si recordamos la ocurrencia de infiltración linfocítica al rededor de los vasos sanguíneos del músculo esquelético en lesiones tempranas de FOP, un cuadro significativo empieza a emerger depictingando la interacción de los sistemas inmune y vascular en la formación de hueso heterotópico.

Evidencias poderosas de las investigaciones de los laboratorios central de FOP, Goldhamer, Shanahan y Pacifici implican significativamente la importancia de los sistemas vascular e inmune en general y de las células linfocíticas y endoteliales específicamente en la evolución de formación de hueso heterotópico inducido por BMP4. Investigación intensa continuará en esta área en el futuro, y estamos a la espera de reportar sus resultados tan pronto ellos se produzcan.

Estamos muy orgullosos de anunciar que dos estudiantes han recibido sus grados como PhD por su trabajo en estos proyectos relacionados con FOP. Ellos son Raga Ramachandran (laboratorio Goldhamer) y Melinda Yin (laboratorio Pacifici). Raga y

Melinda son, de acuerdo a nuestros datos, los primeros estudiantes en recibir sus grados como PhD con base en su trabajo en FOP. Nuestras felicitaciones a estos dos jóvenes investigadores y a sus mentores por sus importantes contribuciones a la investigación en FOP.

La continua necesidad de tejidos de lesiones de FOP

Fialmente, es esencial reiterar que ninguno de estos importantes experimentos, hallazgos o descubrimientos hubiese sido posible sin las importantísimas muestras de biopsia de lesiones de FOP que Uds. tan graciosamente nos han provisto. Si bien los experimentos antemencionados describen modelos animales sofisticados de osificación heterotópica, ellos se basan todos primariamente en hallazgos de especímenes de biopsias de FOP. Si bien reconocemos que estas muestras de biopsias fueron obtenidas antes del diagnóstico definitivo de FOP y nunca deben ser obtenidas prospectivamente, estos especímenes de biopsia proveen excelentes pistas y datos sobre FOP que de otra forma nunca hubiesen podido ser reproducidos por cualquier otro medio existente en la actualidad. A todos aquellos en la comunidad de FOP que al leer este reporte recuerden haber sido sometidos a biopsia cuyas muestras aun no hemos recibido en el laboratorio de FOP, queremos solicitarles el favor de contactarnos para tratar de obtener tales muestras para continuar nuestra investigación en el futuro. Así como las familias multi-generacionales son tan importantes para el proceso de identificación genética, así las lesiones de FOP proveen material invaluable para determinar las características de esta enfermedad a nivel celular y tisular.

Si nos contactan, nosotros les proveeremos con las formas apropiadas que autorizaran al hospital o clínica donde se realizó la biopsia a remitirnos tales especímenes para revisión y estudio.

IV. MODELOS

La importancia de modelos animales para FOP

El desarrollo de modelos animales relacionados con FOP es un paso mayor en el desarrollo de tratamientos efectivos. Si bien las condiciones tipo-FOP han sido descritas esporádicamente en gatos domésticos, en cerdos y el año pasado en un perro, no existen actualmente animales vivos que puedan ser estudiados. Aun más, es dudoso si la condición tipo-FOP en gatos, cerdos o perros es realmente FOP. El lograr un modelo animal realmente creíble que simule la FOP en humanos probablemente tendrá que esperar al descubrimiento del gen responsable de la FOP. Hasta que tal descubrimiento ocurra y sea verificado, continuaremos desarrollando tratativas para crear un modelo animal confiable y verdadero basado en la manipulación de genes idénticos en el ratón.

El sistema de gel de matriz BMP-4: Un modelo animal útil

En el interim, el modelo animal más confiable para la inducción de lesiones aisladas de tipo FOP es proteína humana BMP-4 recombinada (producida por ingeniería genética) mezclada con una sustancia transportadora heterogénea llamada matriz ge que es

inyectada al musculo del raton. Este continua siendo el sistema mas util para la reporduccion de todos los estados conocidos de osificacion heterotopica tipo FOP. Estos estados incluyen infiltracion de celulas linfociticas y mastocitos, la muerte de las celulas musculares esqueleticas, la foramcion de lesiones fibroproliferativas altamente angiogenicas, la transformacion de lesiones fibroproliferativas en cartilago, la calcificacion del cartilago y el eventual reemplazo de cartilago calcificado por hueso maduro heterotopico conteniendo elementos de medula osea. Hemos usado este modelo para estudiar los eventos inflamatorios tempranos asociados con osificacion heterotopica inducida por BMP incluyendo infiltracion linfocitaria y mastociticaasi como para probar los efectos de compuestos anti-angiogenicos tales como esqualamina y los antagonistas de BMP como la proteina noggin. El modelo de implante muscular de matiz gel con proteina BMP-4 recombinada continua siendo un modelo util para evaluar varios tratamientos de FOP y probablemente continuara siendolo hasta que se desarrolle un modelo animal mejor basado en las mutaciones geneticas precisas que causan FOP. Nos referiremos a este modelo animal posteriormente en la seccion de tratamiento cuando revisemos el reciente descubrimiento fundamental que “comprueba el concepto” del uso de terapia genetica con la proteina noggin para inhibir la osificacion heterotopica inducida por BMP-4 en el raton (descrita inicialmente el año pasado). Una publiacion cientifica importante fue remitida para revision y publicacion, detallando el sistema de matriz gel-BMP4.

Linfocitos de pacientes con FOP inducen lesiones tempranas tipo-FOP en el raton desnudo

Durante el año pasado, hemos continuado el desarrollo y validacion de un modelo de cultivos celulares de linfocitos relevante a la patologia molecular temprana y la histopatologia de FOP. La validez de este sistema de celuas linfocitarias se basa en la siguiente serie de observaciones y hallazgos experimentales en los linfocitos de FOP asi como en las vias de trasduccion de las señales de BMP4 en celulas relacionadas:

1. La acumulacion perviascular de linfocitos B y linfocitos T (con la subsecuente infiltracion y muerte del tejido muscular esqueletico) es el hallazgo histopatologico mas temprano en FOP.
2. La señalizacion de BMP4 regula la diferenciacion temprana de los linfocitos.
3. BMP4 esta super expresada en linfocitos de las lesiones de pacientes con FOP.
4. Inmunizaciones de rutina (activacion iatrogenica del sistema inmune) conllevan a la osificacion heterotopica del musculo esqueletico en los sitios de inyeccion en los pacientes con FOP pero no en controles normales.
5. Los linfocitos circulantes en pacientes con FOP presentan disregulacion de la señal de BMP.

Estos datos sugieren que los linfocitos son un modelo celular informativo relevante a la patologia molecular e histopatologia tempranas de la FOP. Los linfocitos de la sangre sof facilmente obtenibles (a traves de una venipuntura de rutina) y se pueden utilizar rapidamente para experimentos de laboratorio. Ellos se pueden immortalizar en el laboratorio y utilizar para estudios en sistemas de experimentacion animal.

Para determinar la capacidad de las células linfoblastoides de FOP para inducir lesiones de FOP, implantamos subcutáneamente células linfoblastoides obtenidas de pacientes con FOP y de miembros de la misma familia no afectados por la enfermedad en un ratón desnudo atímico (un ratón inmuno comprometido que no rechazara células de especies diferentes tales como células humanas). Las células de individuos no afectados no crecieron o formaron pequeñas masas con muy poca evidencia de actividad fibrotica o angogénica. En un contraste dramático, las células de pacientes con FOP produjeron masas de tipo tumoral sólido en los animales experimentales.

La evaluación histopatológica de estas lesiones indicó que las células de FOP indujeron angiogénesis y respuesta fibrotica en el huésped ratón, de apariencia similar a lesiones tempranas de FOP. Estas lesiones tipo FOP inducidas por células fueron sometidas a pruebas genéticas para secuencias genéticas específicas del humano, confirmando que tales masas celulares contenían tanto células humanas como células del huésped. Estos resultados sugieren que las células originales de pacientes con FOP indujeron cambios en el crecimiento y/o diferenciación celular en forma similar a los eventos en lesiones tempranas de FOP. Como resultado, el implante de células derivadas de FOP en ratones desnudos está empezando a producir un modelo celular extremadamente útil para examinar los estados tempranos de la formación de lesiones en FOP y ultimamente para proveer un modelo intermediario para probar medicamentos potenciales.

El pez-zebra como modelo animal en FOP

El pez-zebra, un pez de aguas tropicales que puede crecer en el laboratorio, se ha constituido en un organismo vertebrado progresivamente popular para investigación. Las ventajas de este pez incluyen su tamaño y la transparencia óptica de los embriones, factores que permiten la inspección visual de órganos internos y tejidos en embriones vivos. La fertilización y el desarrollo embrionario ocurren por fuera del cuerpo de la madre, permitiendo un acceso fácil a los embriones. De aquí que el pez-zebra sea el más apropiado de todos los vertebrados para análisis genéticos.

En Noviembre del 2000, la Dra. Mary Mullins, profesora asociada de biología celular y del desarrollo en la Universidad de Pensilvania y uno de los expertos mundiales en el desarrollo del pez-zebra, estuvo invitada al Tercer Simposio Internacional de FOP en Filadelfia. Ella declaró “Yo asistí al simposio de FOP aquí en Filadelfia y me impactaron los efectos debilitantes de esta enfermedad y la falta de tratamientos efectivos para los niños. La implicación fuerte de señalización ectópica de BMP en el desarrollo de FOP me llevó a considerar como nuestros estudios de BMP en el pez-zebra y mi experiencia en el pez-zebra podrían ser aplicados a entender y posiblemente desarrollar tratamientos para FOP”.

En su laboratorio, la Dra. Mullins ha aislado mutaciones en varias vías de señalización genética de BMP incluyendo los homólogos en el pez-zebra de BMP2 y BMP4, así como varios de los receptores de BMP. Mutaciones en todos estos genes causan defectos en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario del pez-zebra y la Dra. Mullins ha

estudiado estos genes extensivamente.

En el 2002, la Dra. Mullins fue premiada con un Grant de Desarrollo del Centro para Investigacion en FOP y Desordenes Relacionados para desarrollar un modelo de FOP de super-expresion inducible por BMP en el pez-zebra. La Dra. Mullins tambien examinara la funcion de varios antagonistas de BMP y antagonistas-agonistas mixtos en la regulacion de la esquelotogenesis.

Como miembro del Centro de FOP, la Dra. Mullins sabe sobre el descubrimiento de niveles anormalmente altos de receptores activados de BMP en la superficie de celulas de FOP. Usando los nuevos sistemas inducibles de expresion molecular que ella ha desarrollado, la Dra. Mullins puede experimentar sobre la posibilidad de que diferentes niveles de elevacion de los receptores de BMP sean suficientes para causar un sindrome tipo-FOP en el pez-zebra. La Dra. Mullins ha desarrollado transgenes de un receptor critico de BMP inducibles por choque de calor al fundir la proteina promotora del choque de calor con la secuencia que codifica el gene del receptor de BMP. Ella ha demostrado en multiples lineas transgeneticas que estos genes desarrollados pueden producir un fenotipo mutante respectivo, comprobando la utilidad de este sistema de transgenes inducibles como un instrumento de expresion genetica. En el pasado, tales estudios habian utilizado inyecciones de ARN mensajero para producir la superexpresar genes, pero esta via experimental limita los estudios de superexpresion genetica a estados tempranos del desarrollo embrionario. El transgene desarrollado por choque de calor por la Dra. Mullins permite estudiar los componentes de la via de superexpresion de BMP en estados mas tardios del desarrollo e incluso hasta la vida adulta del pez-zebra.

Estos mecanismos moleculares “artisticamente -guiados”seran utilizados en estudios en via de realizacion para producir la superexpresion de varios componentes de la via de señalizacion de la BMP4 en el pez-zebra, desarrollando un sistema animal potencial para FOP. Este es un mecanismo nuevo e importante en la investigacion de FOP y Uds. escucharan mucho mas del mismo en el futuro.

V. AGENTES INICIADORES

El sistema inmune y FOP

Evidencia creciente originada en todos los niveles de investigacion sugiere el compromiso del sistema inmune en FOP. La presencia de linfocitos y celulas mastocitarias en lesiones tempranas de FOP, la muerte del musculo esquelotico asociada a los linfocitos, recaidas de la enfermedad en presencia de infecciones virales, las recaidas intermitentes y la respuesta benefica de recaidas tempranas al uso de corticosteroides son piezas de evidencia importantes que soportan un compromiso del sistema inmune en la patogenesis de las recaidas de FOP. Algunos han sugerido que las caracteristicas clinicas y patologicas de FOP sugieren un componente autoinmune en esta condicion, tal vez un mecanismo iniciador autoinmune.

Las enfermedades autoinmunes, con la excepcion de artritis reumatoide y la inflamacion tiroidea autoinmune, son individualmente raras, pero en conjunto afectan

aproximadamente el 5% de la población de los países occidentales. Las enfermedades autoinmunes son un grupo fascinante pero pobremente entendido de enfermedades. Una enfermedad autoinmune se define como una condición clínica causada por la activación de linfocitos T o linfocitos B o ambos en ausencia de una infección u otra causa discernible. Susceptibilidad genética, iniciadores ambientales o internos de autoreactividad, cambios en los procesos patológicos a medida que la enfermedad progresa, y múltiples mecanismos de injuria tisular han sido considerados causas de enfermedades autoinmunes. Una división útil de las enfermedades autoinmunes distingue entre aquellas en las cuales hay una alteración general en la selección, regulación y muerte de los linfocitos T o linfocitos B y aquellas en las cuales una respuesta aberrante a un antígeno particular causa autoinmunidad.

Interacción entre el linfocito y la célula endotelial: marcadores tempranos de inflamación

La migración de linfocitos de su localización intravascular a una localización justo por fuera de la membrana de la célula endotelial es el evento microscópico más temprano observado en una recaída en FOP. Como el linfocito deja el vaso sanguíneo y gana acceso al músculo esquelético donde producirá la subsecuente muerte de la célula esquelética? La mayoría de los linfocitos expresan integrinas, sensores celulares que actúan como moléculas señaladoras. Estas integrinas interactúan con receptores tales como moléculas de adhesión de la célula vascular en la superficie de las células endoteliales para regular la infiltración de linfocitos en órganos sólidos como el músculo. La superficie de linfocitos y monocitos activados expresa integrina alfa-4, una glicoproteína que juega un papel crítico en su capacidad de adherirse al endotelio vascular y en la migración subsecuente a varios órganos.

Actualmente estamos investigando la identidad de tales integrinas en los linfocitos y las células endoteliales en las muestras limitadas de tejido de FOP que tenemos disponibles. La identificación de integrinas específicas en linfocitos activados en lesiones de FOP podría proveer importantes puntos de acción terapéuticos para agentes farmacológicos disponibles tales como anticuerpos monoclonales humanizados en etapas tempranas de lesiones de FOP. Este continuará siendo un tópico importante de investigación en el 2003, y Uds. escucharán más sobre el mismo en futuros reportes.

VI. TRATAMIENTOS

El objetivo final de la investigación en FOP es desarrollar tratamientos que prevengan, detengan y eventualmente sean capaces de revertir la progresión de esta condición.

Abriendo el camino para los antagonistas de la BMP4

El año pasado describimos un descubrimiento importante en investigación en FOP en el campo de la terapia genética. Este descubrimiento, más apropiadamente llamado un “concepto de prueba”, provee los fundamentos para continuar nuestro trabajo en esta área. Para poder presentar un recuento completo de este importante trabajo, planeamos

revisar cada año la información básica relevante para que aquellos quienes son nuevos a esta historia puedan entender y seguir coherentemente su desarrollo y progreso.

Hace varios años, después del descubrimiento de la super expresión de BMP4 en células de FOP, Brigid Hogan, una distinguida bióloga del desarrollo en la Universidad de Vanderbilt en Nashville, Tennessee, escribió en la revista Science: “Con tal cantidad de descubrimientos sobre los mecanismos de acción de las BMPs, es muy posible desarrollar medicamentos que bloqueen alguna parte de la vía de la BMP4 y, como consecuencia, prevengan la progresión de lo que es una enfermedad horrible y tormentosa”.

La proteína noggin: bloqueo de la vía de BMP4

La proteína noggin, descubierta por nuestro colaborador el Dr. Richard Harland de la Universidad de California en Berkeley, tiene efectos poderosos como antagonista de la actividad de BMP4. El día siguiente a la publicación de nuestro descubrimiento de super expresión de BMP4 en el New England Journal of Medicine, el Dr. Harland y sus colegas publicaron un artículo fundamental en la revista Cell demostrando que la proteína noggin se une directamente a la molécula nativa de BMP4 y evita la interacción de tal molécula con su receptor propio. La importancia de la proteína noggin en la historia de FOP se hizo aparente inmediatamente y la proteína noggin se convirtió en la vanguardia del desarrollo de tratamientos para la FOP.

La proteína noggin participa en el control de la cantidad de esqueleto que se forma a través de su capacidad para regular las concentraciones de BMP4 disponibles en los tejidos corporales. Por esta razón, dicha proteína noggin ofrece promesas considerables como controladora del crecimiento rampante de hueso en FOP. Tempranamente luego del descubrimiento de super expresión de BMP4 en FOP, fuimos contactados por científicos de la compañía Regeneron Pharmaceuticals quienes sugirieron conformar una investigación colaborativa entre el laboratorio de FOP, el Dr. Harland, los científicos relacionados en el desarrollo de vectores de terapia génica y los científicos del laboratorio de Regeneron Pharmaceuticals, para explorar la posibilidad de desarrollar la proteína noggin como un tratamiento para FOP. Hemos estado trabajando en conjunto desde entonces.

El experimento la “prueba del concepto” en la terapia del gene noggin

En el 2001 nosotros iniciamos un experimento crítico llamado la “prueba del concepto”. Los resultados de este experimento demostraron dramáticamente que una forma de proteína noggin pudo ser producida en el hígado de un animal mamífero gracias al uso de ingeniería genética enfocada directamente a modificar el gen noggin y circular sistémicamente para bloquear completamente la osificación heterotópica inducida por la BMP4 en el ratón.

El propósito de este estudio fue desarrollar una terapia génica efectiva para la prevención de osificación heterotópica mediada por BMP4 que pudiera ser aplicable en principio a pacientes con FOP. Para alcanzar esta meta, utilizamos la transferencia de un

gene noggin modificado genéticamente, mediada por un adenovirus

La proteína noggin natural no circula en el torrente sanguíneo y tiene una vida media muy corta. La proteína noggin no circula en la sangre porque se une a azúcares complejos en las paredes de los vasos sanguíneos (llamados proteoglicanos de heparan sulfato o HSPGs). Esta capacidad de unirse a estos azúcares hace que la proteína noggin no pueda ser utilizada para tratar una enfermedad como la FOP. Por consiguiente, si se quiere aplicar noggin vía sistémica (a través de todo el cuerpo), el gene que produce la proteína noggin debe primero ser modificado para permitir que la proteína circule a través de la sangre y que tenga una vida media más prolongada en la circulación.

El gene noggin nativo del humano fue modificado removiendo una porción de la secuencia de ADN que produce la parte de la proteína que produce su unión a las paredes de los vasos sanguíneos. Una vez lograda tal modificación del gene noggin, la proteína producida por el gene modificado pudo circular a través de los vasos sanguíneos sin unirse a sus paredes pero reteniendo su capacidad de unirse e inactivar la molécula de BMP4. Mas aun, esta modificación en el gene noggin y su proteína asociada aumentaron su vida media en la circulación, permitiendo el uso de la vía sistémica de administración.

Este experimento utilizó el modelo de formación de hueso heterotópico inducido por BMP4 en el ratón. Este modelo, descrito anteriormente en el presente reporte, nos permite identificar los varios estados de la formación de hueso inducida por BMP4 en una forma que semeja muy cercanamente la formación de hueso en una lesión de FOP. Luego de la aprobación por el Comité de Uso Investigativo Animal, inyectamos en 32 ratones un músculo subcutáneo a un lado de la línea media con matrigel solo y en el lado contralateral con matrigel combinado con BMP4 recombinante humana. La dosis de BMP4 utilizada fue aquella que produce consistentemente formación de hueso heterotópico. La mitad de los ratones fueron pre-tratados por cuatro días con una inyección intravenosa del adenovirus recombinante que contenía el gene humano noggin modificado. La otra mitad de los animales se utilizó como grupo control y fueron pre-tratados por cuatro días con un adenovirus recombinante que no contenía ningún gene. Los implantes de matrigel fueron recuperados en los días 7 y 14 después de la inyección. Se utilizaron técnicas histológicas estándar para evaluar los varios estados de formación de hueso y para identificar los tipos celulares específicos presentes en el tejido.

Implantes de los grupos experimental y de control se obtuvieron en todos los animales. Los implantes que contenían la BMP4 humana recombinante indujeron una lesión fibroproliferativa agresiva con formación temprana de cartilago a los 7 días y osificación heterotópica a los 14 días en animales control. Sin embargo, en animales pre-tratados con el gene noggin modificado, los implantes de BMP4 no produjeron lesión alguna tanto a los días 7 como 14.

Este importante estudio demuestra que el uso de terapia genética para producir una proteína noggin modificada previene exitosamente la osificación heterotópica inducida por BMP4 en el modelo del ratón. El experimento provee “prueba del concepto” de que un antagonista morfogenético codificado genéticamente (noggin) puede ser producido in

vivo y actuar sistemicamente para prevenir la osificacion heterotopica mediada por BMP4, que es clinicamente relevante al tratamiento de la FOP.

Este avance mayor en la terapeutica comprueba el concepto de que el gene noggin puede ser modificado para permitir la accion sistematica de una proteina producida por ingenieria biologica, que tal gene puede ser insertado en un vector viral, que el higado puede actuar como fuente de produccion activa de proteina modificada, que la proteina modificada puede circular sistemicamente como una hormona y que, a concentraciones terapeuticas, la proteina noggin modificada puede unirse efectivamente e inactivar niveles ambientales de proteina recombinante humana BMP4 y bloquear completamente la produccion de hueso en la lesion mas rudimentaria del tipo FOP.

Terapia con el gene Noggin: desarrollos mayores en el año 2002

Nuestro experimento fundamental de la "prueba del concepto" fue informado inicialmente en nuestro reporte anual el año anterior (y reproducido anteriormente). Durante el año 2002, hemos producido cuatro desarrollos mayores en la terapia con el gene noggin:

1. El desarrollo de una tecnica de radioinmunoensayo altamente sensible y especifica para medir la concentracion sanguinea de la proteina noggin modificada geneticamente.
2. La exploracion, desarrollo y el uso de vectores virales seguros (virus asociados al adenovirus) para la administracion sistematica del gene noggin.
3. Estudios para determinar si la forma del gene noggin producida por ingenieria genetica causa toxicidad especifica a algun organo en el raton.
4. La exploracion de sistemas de administracion sistematica basados en celulas especificas para la terapia con el gene noggin producido por ingenieria genetica.

El desarrollo de una tecnica de radioinmunoensayo altamente sensible y especifica para medir las concentraciones sanguineas de la proteina noggin modificada geneticamente es un paso necesario para cualquier experimento animal en el futuro y eventualmente para el tratamiento en el humano. Este trabajo se realizo en el laboratorio central de FOP durante el año pasado. El radioinmunoensayo para noggin es critico no unicamente para determinar el nivel de proteina noggin modificada geneticamente en la circulacion de animales de experimentacion, sino para determinar si el raton produce o no anticuerpos contra tal proteina. Es posible que, con el tiempo, el raton desarrolle anticuerpos contra la proteina noggin humana. Aunque las proteinas noggin humana y del raton son extremadamente similares en su secuencia, ellas pueden aun diferir lo suficientemente como para inducir la formacion de anticuerpos.

Motivo de mayor preocupacion para estudios en el humano es la posibilidad de que la modificacion de la proteina noggin nativa humana genere una respuesta de anticuerpos en los pacientes. El hecho de trazar el gene noggin para producir una proteina modificada circulante que carece de su dominio de union a la heparina produce una molecula que

tiene una forma ligeramente diferente y una configuración tri-dimensional diferente a la proteína nativa. Tal proteína modificada puede ser reconocida como una proteína extrínseca al sistema inmune humano. Como resultado, eventualmente se requerirán experimentos exhaustivos para el desarrollo de la terapia genética con noggin en el humano. Nosotros estamos bien al tanto de tales consideraciones y desde ya son puntos sobresalientes en nuestros planes para desarrollar una terapia más definitiva en FOP. Alternativas, por ejemplo, pueden ser administrar el gene noggin nativo (en vez del noggin modificado) a las células precisas del sistema muscular esquelético donde se inicia la lesión FOP. El conocimiento creciente de tales células, como se describió anteriormente en este reporte, podría permitir tal posibilidad en el futuro.

El desarrollo y uso de vectores virales más seguros para la administración del gene noggin será crítico al considerar si tal gene o un gene noggin modificado puede ser administrado en el humano vía un sistema basado en virus. Aunque el adenovirus es un sistema excelente de administración tal como se demostró en el experimento de la prueba del concepto de la terapia genética con noggin, el vector adenovirus produce una respuesta inmune intensa en el humano y es inaceptable para uso humano a largo plazo. Nuestros colegas del Instituto de Terapia Genética Humana en Penn han aislado nuevos virus asociados con el adenovirus y están desarrollándolos como vectores para terapia genética humana. En general los virus asociados con el adenovirus son mucho menos tóxicos sistémicamente (aunque aún pueden causar cierta toxicidad) y generan una reacción mucho menos robusta del sistema inmune. La esperanza era que estos nuevos virus relacionados con el adenovirus pudieran ser desarrollados como vectores de terapia genética humana, con mejor eficacia en su capacidad de transferencia genética y que no fueran reconocidos por los anticuerpos generados en el humano como respuesta a infecciones por adenovirus. De hecho, este fue el resultado. Estos nuevos vectores de administración han sido utilizados en nuestros experimentos de terapia con el gene noggin modificado durante el año pasado y demostraron ser extremadamente eficaces en su capacidad para transferir una dosis adecuada de proteína noggin modificada en forma sistémica capaz de inhibir la osificación heterotópica en el modelo animal. Estos nuevos virus asociados con el adenovirus son mucho menos tóxicos que los adenovirus usados inicialmente en el modelo del ratón y generan una respuesta inflamatoria mucho menor especialmente en el hígado donde se fabrica la proteína noggin modificada. Además, este vehículo de administración genética más seguro es necesario para estudiar efectos aislados y potencialmente tóxicos de altas dosis sostenidas la proteína noggin modificada en el modelo animal. En otras palabras, es necesario inicialmente minimizar los efectos tóxicos del vehículo de administración (virus) que lleva el gene noggin modificado antes de estudiar efectivamente cualquier efecto tóxico de la proteína noggin modificada per se. Los estudios para determinar si estos nuevos virus asociados con el adenovirus podrían utilizarse para administrar la proteína noggin modificada a dosis lo suficientemente altas para inhibir la osificación heterotópica fueron extremadamente satisfactorios.

Estudios preliminares de toxicidad en el ratón usando el nuevo sistema de administración por medio del vector virus asociado al adenovirus (AAV) indican que aunque este vector induce menos inflamación en el hígado que el adenovirus, la proteína noggin y la proteína noggin modificada per se pueden ser tóxicas a dosis altas sostenidas. Estos

hallazgos son compatibles con estudios que muestran que las BMP son importantes en el desarrollo y mantenimiento del hígado. Como consecuencia, si se consiera la posibilidad de usar noggin en el humano, es necesario que su administración sea regulada en la forma más precisa posible y que su concentración se mantenga en el mínimo nivel efectivo por el periodo de tiempo más breve requeridos para inhibir la osificación heterotópica. Como resultado de esto, se hace más necesaria en la actualidad la exploración de sistemas de regulación e inducción para la administración de antagonistas de BMP (tales como noggin) y la dirección de la terapia con noggin a células que son blanco directo de la acción de BMP o a células en la vecindad de esas células blanco de la BMP.

Previamente en este Reporte Anual (Sección III. Células), discutimos importantes descubrimientos en determinar las células blanco de la acción de BMP dentro del sistema del músculo esquelético. Estos descubrimientos nuevos y excitantes de la biología celular de la osificación heterotópica serán tremendamente importantes para diseñar la terapia celular más apropiada para dirigir la terapia genética. El propósito final es poder dirigir un promotor inducible del gene noggin nativo precisamente a aquellas células que responderán a la señal de BMP4 dentro del músculo esquelético e iniciarán su transformación hacia tejido óseo. Si bien los hallazgos de laboratorio y las investigaciones de tratamiento se presentan separadamente en este reporte, no debe escapara a nadie el hecho de que la investigación en FOP es por naturaleza integrativa de estos diferentes componentes.

Actualmente estamos explorando estas nuevas opciones de administración de genes con base en células y al mismo tiempo estamos trabajando en desarrollar un promotor inducible para la administración del gene noggin modificado a través de los nuevos virus asociados al adenovirus. Estamos actualmente trabajando con los científicos y los abogados de dos firmas farmacéuticas para facilitar el desarrollo de un promotor inducible (un interruptor molecular regulado por drogas) que pueda ser utilizado en la próxima fase de la terapia genética con noggin en el 2003.

Terapia con el gene noggin: el futuro

Es necesario vencer numerosos obstáculos técnicos antes de poder considerar el uso de la terapia genética noggin para el tratamiento de pacientes con FOP. Estos incluyen el refinamiento de vectores virales seguros y efectivos para su uso en humanos, el desarrollo de un sistema de administración inducible y regulado del gene noggin, estudios de toxicidad completos en la administración sistémica de noggin y del noggin modificado, y finalmente el desarrollo de modelos animales mejorados de acuerdo con nuestros conocimientos de la genética molecular en FOP. Sin embargo, para pacientes quienes sufren de FOP la transferencia genética de un antagonista inducible de BMP4 puede eventualmente ofrecer una esperanza donde otras modalidades de tratamiento han sido fallidas.

El éxito en la terapia genética en FOP, como en cualquier otra enfermedad genética, requerirá el uso trabajo coordinado y colaborativo de genetistas, virologos, inmunólogos, bioquímicos, biólogos celulares y clínicos. El vector viral óptimo para la terapia genética

en FOP debera poder ser administrado por sistemas no invasivos, dirigido a celulas o tejidos especificos, e inducido a expresar una cantidad terapeutica de proteina noggin durante una cantidad de tiempo regulada. Todos estos aspectos de la terapia genetica con noggin estan siendo perseguidos con intensa actividad. Como hemos descrito, los virologos han generado suficientes vectores virales seguros y eficientes tales como el AAV para introducir las cpas extras del gene noggin en el cuerpo humano. Los biologos moleculares ayudaran a diseñar vectores capaces de identificar celulas especificas y tejidos especificos para la expresion del gene noggin. Los inmunologos continuaran el desarrollo de mecanismos para prevenir consecuencias inmunologicas no deseables en el uso de terapia viral y su carga de proteina noggin modificada. Los biologos celulares desarrollaran vias para facilitar la transferencia genetica a varios tejidos e identificaran celulas musculares o del torrente sanguineo a las cuales se les pueda introducir el vector viral. Los clinicos realizaran ensayos clinicos en pacientes con FOP con los mejores vectors suplidos por los cientificos. Para alcanzar exito en la terapia genetica en pacientes, se necesita la contribucion de muchas ramas de la biologia y la medicina.

No es posible determinar actualmente cuando y si la terapia genetica con noggin sera una realidad practica para el manejo clinico de niños y adultos con FOP, pero en la actualidad, es nuestra mejor esperanza y continuaremos persiguiendola incansablemente hasta que, o bien se torne en realidad, o surjan mejores posibilidades de tratamiento. La posibilidad que la terapia genetica con noggin sea una realidad en pacientes con FOP depende de muchos problemas tecnicos enumerados anteriormente y muchos problemas cientificos que han sido descritos en el presente Reporte Annual. Lo mas importante es determinar el gene de la FOP, identificar todas las celulas blanco y elucidar todas las vias moleculares de accion. En ese momento, claramente, surgira la mejor opcion terapeutica en FOP. Mientras tanto, continuaremos adelante en nuestra experimentacion con el gene noggin ya que es la mejor esperanza que tenemos en la actualidad.

Noggin: Claro como el cristal

En un trabajo relacionado con nuestra investigacion, el Dr. Jay Groppe, un cristalografo de rayos-x quien trabaja en el Instituto Salk en La Jolla, California, publico recientemente un articulo mayor en la revista Nature sobre la estructura cristalografica bajo rayos-x (molecular tridiemsonal) de la proteina noggin cuando se une a la molecula de BMP. El trabajao es una extraordinaria realizacion teconologica. En su articulo titulado ‘Las bases estructurales de la señalizacion inhibitoria de BMP por Noggin, una nueva proteina ligada a la cistina’, el Dr. Groppe y sus colegas discuten como el juego entre proteinas morfogenicas de hueso y sus antagonistas gobierna numerosos procesos celulares y de desarrollo en el cuerpo humano y a traves del reino animal. En su articulo, muestran exacta y elegantemente como la estructura tri-dimensional de noggin le permite inhibir la señalizacion de BMP bloqueando la interaccion de BMP con sus dos receptores transmembrana. Ademas demuestran como la union de BMP y noggin secuestra la molecula de BMP para formar un complejo inactivo.

En una visita especial al Centro para la Investigacion en FOP y Desordenes Relacionados en Noviembre del 2002, el Dr. Groppe explico como noggin y varios BMP parecen haber

evolucionado a partir de un gene ancestral comun. Las proteinas codificadas por los genes BMP y noggin estan intimamente relacionadas no solo en estructura sino en forma. De hecho, cuando noggin se une con BMP lo hace en una oposicion perfecta con ambas moleculas en configuracion plana. "Es como si dos mariposas se unieran por sus espaldas con la proteina noggin mas voluminosa envolviendo la molecula BMP mas pequena semejando una llave Nelson de lucha libre", explico el Dr. Groppe.

El Dr. Groppe añadio informacion demostrando como tanto BMP como noggin tienen dominios que fijan la heparina, grupos de aminoacidos en sus respectivas proteinas que permiten que las moleculas se unan en la superficie celular a proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs) lo que permite concentrar las moleculas cerca de su sitio de señalización en la superficie de la membrana celular. Mas importantemente, el demostro como los sitios de union a la heparina en ambas porteinas BMP y noggin estan localizados en polos opuestos de las moleculas donde ellas se fijan entre si, permitiendo que los sitios de union a la heparina de ambas moleculas se unan a sus respectivas superficies celulares. Esto tiene implicaciones enormes en la regulacion de la señalización de BMP.

Aun de mayor importancia es el hecho de que el Dr. Groppe demostro graficamente y dramaticamente como la modificacion molecular de gene noggin para remover el sitio de union a la heparina no afecta para nada la habilidad de la molecula de unirse y secuestrar BMPs, una confirmacion importante de nuestras experiencias con la terapia con el gene noggin modificado descrita en la seccion previa. Evidencia experimental a nivel bioquimico ha demostrado que este hecho es una realidad, pero el poder y la belleza de la cristalografia de rayos-x demostro que este mecanismo es veridico.

El Dr. Groppe discutio como la regulacion extracelular de la actividad de BMP tiene como caracteristica unica entre las vias de señalización el hecho de que duplicaciones tanto de los genes BMP como de los genes de los receptores de BMP pueden haber conducido al desarrollo de antagonistas estructuralmente-relacionados (tales como noggin), capaces de regular la disminucion de la actividad de BMPs. El Dr. Groppe escribe en la ultima oracion de su articulo: "La sorprendente homologia estructural entre agonistas (BMPs) y antagonistas (tales como noggin) provee evidencia del origen ancestral y del desarrollo de las vias de señalización relacionadas con la regulacion de BMP".

En su totalidad el trabajo del Dr. Groppe tiene profundas implicaciones en la señalización de BMP4 en FOP y en la terapia con el gene noggin, asi como en numerosos campos de la biologia molecular, del desarrollo y estructural. Finalmente, en un articulo relacionado aparecido recientemente en Nature, otros investigadores han demostrado como la relacion entre BMP4 y noggin jugo un papel critico en la evolucion de los dinosaurios hacia aves.

La regluacion natural de noggin

Ademas de la habilidad de noggin de unirse y secuestrar multiples BMPs y como consecuencia, prevenir su accion en la activacion de la via BMP, varios de nuestros

colegas han venido realizando trabajos para entender como noggin es regulado en vivo. Durante una visita al Centro para la Investigacion en FOP y Desordenes Relacionados en Noviembre del 2002, nuestro colega el Dr. Aris Economides de Regeneron Pharmaceuticals, explico como durante la fusion de las estructuras craneanas (las partes blandas del craneo del infante que permiten la expansion de los huesos para la formacion final del craneo) durante el desarrollo, la familia de moleculas de los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y sus receptores relacionados inhiben la habilidad de las BMPs para regular el aumento de la expresion de sus antagonistas (tales como noggin). Asi, la superactividad de los receptores del factor de crecimiento de los fibroblastos (como se ve en las craniosinostosis, condiciones en las cuales los huesos del craneo se unen prematuramente), previene las BMPs de aumentar apropiadamente la regulacion de la expresion de noggin. Como resultado, hay un imbalance peligroso entre BMP y noggin que lleva a la formacion excesiva de hueso y a la fusion prematura de los huesos del craneo. Mas importante, la patologia molecular de las craniosinostosis y FOP demuestra que ellas se deben no unicamente a exagerada produccion de BMPs sino muy escasa de antagonistas.

En un trabajo relacionado, datos preliminares del Dr. David Diefenderfer en la Facultad de Medicina Dental de la Universidad de Pennsylvania (quien recientemente recibio un premio de los Proyectos de Desarrollo del Centro para FOP) indica que los glucocorticoides (medicamentos como la prednisona) pueden tener la habilidad de aumentar la expresion de noggin in vitro. Tales hallazgos, si se confirman in vivo, tendran implicaciones valiosas e importantes en la terapia de condiciones tales como FOP y otros desordenes de osificacion heterotopica.

Agentes antiangiogenicos y la Fase I de ensayos clinicos de Esqualamina

El desarrollo y crecimiento del embrion humano asi como el desarrollo y la regresion de tumores dependen del control de la formacion de nuevos vasos sanguineos (angiogenesis). Angiogenesis es tambien un requisito absoluto para la formacion y desarrollo del esqueleto, para la cicatrizacion exitosa de fracturas y para la formacion de hueso heterotopico. Los estados tempranos de la embriogenesis del esqueleto semejan las lesiones preoseas fibroproliferativas altamente vascularizadas de FOP. Como consecuencia, la angiogenesis, un hallazgo histopatologico prominente en lesiones preoseas en FOP, es un blanco potencial para tratamiento de esta enfermedad.

El objetivo de la terapia anti-angiogenica en FOP es la inhibicion de formacion de nuevos vasos sanguineos para retardar la formacion de hueso una vez ha aparecido una nueva lesion. Angiogenesis puede ser potencialmente minimizada con agentes tales como talidomida, esqualamina, inhibidores de la ciclo-oxigenasa 2 (cox-2), aminobifosfonatos (que se discutan en la seccion a continuacion) e inhibidores del factor de crecimiento vascular endotelial.

La esqualamina, un nuevo agente anti-angiogenico con interes potencial en FOP, fue descubierta en 1992 por el Dr. Michael Zasloff. El Dr. Zasloff aislo la esqualamina del higado del tiburón perro y descubrio sus propiedades anti-angiogenicas. La esqualamina

es una molécula de tipo colesterol que ocurre en la naturaleza que inhibe la proliferación de las células endoteliales (células de los vasos sanguíneos) y exhibe potente actividad anti-angiogénica en animales de laboratorio y en humanos. Hace varios años el mecanismo celular de acción de la esqualamina fue elucidado. La esqualamina modifica la respuesta de las células endoteliales a proteínas que organizan su forma y estructura.

La esqualamina se produce actualmente en forma sintética bajo condiciones estériles y no tiene que ser obtenida de los tiburones. En ensayos pre-clínicos, esqualamina ha demostrado inhibir angiogénesis y el desarrollo subsecuente de algunos tumores óseos sólidos. Bloqueando directamente el proceso angiogénico, la esqualamina tiene el potencial de disminuir la progresión de lesiones de FOP en el músculo. Como se describió en una sección previa de este reporte, la esqualamina demostró ser un potente inhibidor de la maduración del cartílago y de la formación de hueso en ensayos del desarrollo relevantes al estudio de la FOP.

Un ensayo clínico en su fase I usando esqualamina en FOP ha sido aprobado por la FDA de los Estados Unidos y está dirigido a un pequeño grupo de pacientes adultos con FOP quienes tienen severas recaídas pre-ósseas. Este ensayo inicial se diseñó para evaluar la seguridad y eficacia del uso de esqualamina intravenosa en la inhibición de angiogénesis en recaídas tempranas de FOP y permite enrolar no más de 10 adultos con FOP. El estudio ha sido completamente aprobado por la FDA, el Consejo de Revisión Institucional de la Universidad de Pennsylvania, el Consejo General de Investigación Clínica del Hospital de la Universidad de Pennsylvania, el Consejo de Seguridad de Radiación, el Comité de Enfermería, el Comité de Farmacia y el Consejo de Monitoreo de Seguridad de datos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Pennsylvania. Mayor información sobre este ensayo clínico en su fase I se puede encontrar en nuestra página del internet en www.ifopa.org.

Prostaglandinas y los Inhibidores Cox-2: Inflamación y FOP

En reportes previos hemos resaltado un grupo importante de una nueva categoría de drogas con implicaciones inesperadas e importantes en el tratamiento de FOP. Estos son los inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (cox-2), medicamentos que actúan específicamente en prostaglandinas pro-inflamatorias. Datos del laboratorio de FOP han mostrado una expresión dramática y robusta de la enzima cox-2 en células fibroproliferativas de lesiones tempranas de FOP.

El cuerpo humano produce esencialmente dos tipos de prostaglandinas: fisiológicas e inflamatorias. Las prostaglandinas fisiológicas son aquellas producidas normalmente en muchos tejidos corporales y protegen órganos tales como el estómago de lesiones metabólicas. Las prostaglandinas inflamatorias se producen en respuesta a daño corporal como un producto activo de la ruptura de los componentes de la membrana celular y juegan un papel mayor en la respuesta inflamatoria a injuria tisular. Medicamentos anti-inflamatorios no-esteroides tradicionales, como la aspirina, ibuprofeno e indometacina inhiben la formación de prostaglandinas, tanto fisiológicas como inflamatorias. Los nuevos inhibidores de la ciclo-oxigenasa 2 (cox-2) bloquean primariamente la formación

de prostaglandinas inflamatorias dejando las fisiologicas relativamente intactas.

Las prostaglandinas inflamatorias son moléculas co-estimuladoras potentes de la inducción de hueso heterotópico, en conjunto con BMPs. Estudios publicados en la literatura ortopédica muestran que la disminución de los niveles de prostaglandinas en animales de experimentación aumenta dramáticamente el umbral de la osificación heterotópica haciendo más difícil (aunque no imposible) la formación de hueso. Animales pre-tratados con altas dosis de inhibidores de las prostaglandinas fueron incapaces de formar hueso heterotópico luego de inyecciones intramusculares de matriz ósea demineralizada conteniendo BMP. En contraste, animales tratados con inhibidores de prostaglandinas al mismo tiempo o después de la administración de la inyección de matriz ósea demineralizada fueron capaces de formar hueso heterotópico. Estos datos sugieren que para que los inhibidores de las prostaglandinas sean verdaderamente efectivos en la prevención de osificación heterotópica, estos medicamentos deben estar “en el sistema” (en otras palabras, circulando en la sangre a niveles terapéuticos) antes de que la célula blanco reciba la señalización de inducción ósea. Además de su potente acción anti-inflamatoria, estudios recientes han demostrado que los nuevos inhibidores cox-2 tienen propiedades anti-angiogénicas potentes así como propiedades anti-inflamatorias, hechos que los hacen aún más deseables en su consideración para tratar FOP.

Un estudio importante publicado en el 2002 por los colegas de la Universidad de Rochester mostró convincentemente que animales tratados con ingeniería genética para eliminar las dos copias del gen que produce la enzima cox-2 (denudados cox-2) no fueron capaces de generar formación de hueso nuevo en el sitio de fractura, demostrando la importancia de la enzima cox-2 en la formación inflamatoria de hueso. Si bien la administración de dosis farmacológicas de inhibidores de la enzima cox-2 (medicamentos que bloquean la actividad de la enzima cox-2) a animales normales tuvo efectos similares, la inhibición de la formación de hueso en ambos grupos de animales (denudados de cox-2 y tratados con inhibidores cox-2) pudo ser revertida con la administración de cantidades masivas de BMP recombinante, indicando que la actividad cox-2 ocurre después de la señalización de BMP y que una superactividad intensa de la vía BMP (como sucede en FOP) puede posiblemente sobrepasar el bloqueo cox-2. Resultados similares fueron informados en un estudio publicado en 2002 por un grupo investigativo liderado por un previo integrante del Laboratorio de FOP quien trabaja actualmente en la Universidad de Medicina y Dentisteria de New Jersey.

Las prostaglandinas inflamatorias estimulan directamente la inducción de proteínas angiogénicas que pueden promover posteriormente la formación de hueso. Los niveles de prostaglandinas inflamatorias se encuentran dramáticamente elevados en la orina de pacientes con FOP, especialmente durante recaídas de la enfermedad. Estas observaciones sugieren la siguiente hipótesis: la disminución de los niveles base de prostaglandinas en pacientes con FOP puede elevar el umbral de la formación de hueso heterotópico aun en presencia de niveles endógenos substanciales de BMP4. Así, si bien la inhibición de cox-2 puede ser incapaz de bloquear efectivamente las lesiones en FOP inducidas por BMP, al menos puede elevar el umbral de la formación de hueso, haciendo este proceso más difícil. Esta hipótesis puede ser comprobada clínicamente y será el foco

de estudios con control de placebo para evaluar la seguridad y eficacia de los inhibidores cox-2 en la prevencion y tratamiento de recaídas de FOP. Este estudio permitira enrolar niños con FOP y ha sido tentativamente aprobado tanto por una compañía farmaceutica importante que ha aceptado a suplir la medicina y el placebo, asi como por la agencia FDA de los Estados Unidos. Este estudio esta siendo preparado para ser sometido a una larga lista de comites reguladores en la Universidad de Pennsylvania y requerira la aprobacion final tanto de la compañía farmaceutica como de la FDA.

Si bien el beneficio potencial de los nuevos cox-2 inhibidores en la prevencion de la osificacion heterotopica no es mayor que el de su clase parental de anti-inflamatorios no-esteroides, los nuevos inhibidores de la cox-2 ofrecen la posibilidad de efectos gastrointestinales un poco menores que el de sus compuestos parentales. Ademas, la vida media de estos nuevos inhibidores de la cox-2 permite su administracion una vez al dia, un factor que promueve la adherencia al tratamiento por parte de los pacientes. Los inhibidores cox-2 se consiguen con prescripcion medica en los Estados Unidos. Si bien no han sido aprobados oficialmente para su uso en niños, estan actualmente siendo ensayados en niños con artritis reumatoidea y se usan esporadicamente por pediatras especialistas para el tratamiento de condiciones inflamatorias severas como FOP donde no existen otras opciones terapeuticas.

Si bien los inhibidores cox-2 son generalmente seguros, su accion debe ser monitorizada cuidadosamente, especialmente en aquellos quienes deben tomar estos medicamentos por un largo periodo de tiempo, ya que pueden ocurrir efectos secundarios raros pero potencialmente mortales como falla renal. Como en cualquier otra condicion, la relacion de riesgo y beneficio de terapias potenciales debe ser cuidadosamente balanceada contra los riesgos potenciales de la condicion base que se esta estudiando o tratando.

Aminobisfosfonatos: Una mina de oro u “oro falso”?

Los bisfosfonatos son una clase potente de medicamentos que tiene efectos profundos en la remodelacion de hueso y ejercen su accion primaria disminuyendo el tiempo de vida de los osteoclastos, las celulas destructoras de hueso en el organismo humano. Los bisfosfonatos son utilizados ampliamente en el tratamiento de numerosas enfermedades donde la resorcion osea excede la formacion de hueso – tales como la osteoporosis, enfermedad de Paget, displasia fibrosa y cancer de hueso.

El bisfosfonato original, Etidronato, cuando se administra a grandes dosis actua poderosamente inhibiendo la mineralizacion de cartilago neoformado y de proteina osea y ha sido propuesto como un tratamiento posible en FOP y otros desordenes de la osificacion heterotopica por mas de 30 años. Si bien su eficacia en FOP es cuestionable, el Etidronato se ha usado en forma limitada en el tratamiento de desordenes mas focales de osificacion heterotopica como aquellos que se presentan luego de trauma de tejidos blandos o lesiones del sistema nervioso central. A diferencia del Etidronato, los nuevos bisfosfonatos incluyendo los aminobisfosfonatos no tienen un efecto apreciable en inhibir la mineralizacion, pero son cientos a miles de veces mas potentes que el Etidronato en inhibir la resorcion osea, una propiedad que dicta su uso actual en un amplio rango de

enfermedades caracterizadas por excesiva resorcion de hueso tales como la osteoporosis.

Por que tales drogas que actuan primariamente inhibiendo la resorcion osea estan siendo consideradas en el contexto de FOP, una condicion en que una disminucion de la resorcion osea no seria deseable (al menos en el esqueleto heterotopico)? A primera vista, el uso de los nuevos aminobisfosfonatos parecia tener muy poca razon en FOP. La historia, sinembargo, no es tan simple.

Nosotros todos sabemos que las medicinas tienen efectos secundarios y es un hecho interesante en la practica medica que ocasionalmente algunas medicinas han sido utilizadas erronea o coincidentalmente produciendo efectos beneficos no-anticipados. Muy frecuentemente un efecto nuevo de un medicamento se descubre al azar o accidentalmente solo despues de la autorizacion del uso de ese medicamento para un efecto especifico. Tal fue el caso, por ejemplo, cuando se descubrio (en los tempranos 1940s) que los antihistaminicos eran efectivos no solamente como antialergicos sino para prevenir el mareo por movimiento. Un internista en la Facultad de Medicina Johns Hopkins, mientras trataba a su paciente para alergias con un nuevo antihistaminico, le pregunto como se sentia con esta nueva medicina. La paciente le dijo al doctor que sus sintomas de alergia estaban mucho mejor pero ademas, para su sorpresa, ella no presentaba mareo cuando viajaba en el tranvia, un problema que ella habia sufrido durante toda su vida. Ella atribuyo la ausencia del mareo al nuevo antihistaminico al notar que no presentaba mareo si tomaba la medicina y que el mareo estaba presente cuando no tomaba la medicina. Esta simple observacion condujo a una serie de estudios de finalmente validaron la observacion de la paciente. Asi, el encuentro de un medico con una paciente condujo a un descubrimiento fortuito en el uso de antihistaminicos para la enfermedad del mareo por movimiento – un descubrimiento que tuvo un impacto inmediato en el transporte de tropas desde los Estados Unidos a operaciones en el Pacifico Sur y Europa durante la Segunda Guerra Mundial.

Una situacion similar ocurrio recientemente con el uso de aminobisfosfonatos en el tratamiento de la FOP. En el año anterior hemos tenido conocimiento de reportes anecdoticos pero extremadamente veraces de medicos y pacientes con FOP en todo el mundo sobre la respuesta de recaidas de FOP a la administracion de Pamidronato, uno de los nuevos aminobisfosfonatos. Por que considerar Pamidronato para el tratamiento de recaidas de FOP? Ironicamente, en todos los tres casos que hemos conocido, el Pamidronato se uso erroneamente con la idea de que su efecto inhibidor de la mineralizacion era mucho mas potente que el del Etidronato. No lo es. Ninguno de los nuevos bisfosfonatos, incluyendo Pamidronato tienen algun efecto en la mineralizacion. Sinembargo, todos los tres pacientes reportaron disminucion substancial en inflamacion, enrojecimiento y dolor luego de la administracion de altas dosis de Pamidronato intravenoso durante una nueva recaida. Un paciente recibio Pamidronato unicamente mientras en los otros dos el medicamento fue administrado con un esteroide oral (tal como Prednisona) por varios dias durante las fases tempranas de una nueva recaida de FOP.

Todos nosotros en la comunidad de FOP sabemos que tales observaciones anecdoticas

pueden ser puramente coincidentes – es decir, que tales recaídas de FOP pudieron haber mejorado espontáneamente sin tratamiento y que el Pamidronato pudo no haber tenido nada que ver con la mejoría. Además existe la posibilidad de un efecto placebo en una observación no-controlada. Sin embargo, uno no puede negar la posibilidad que tales observaciones puedan tener papel en el tratamiento de FOP. Es totalmente posible tropezar con algo valioso aun por las razones incorrectas!

A medida que la noticia de esta respuesta asociada al Pamidronato (con o sin esteroides) se extendía entre la comunidad de FOP durante los meses pasados (generalmente vía comunicaciones en el internet entre pacientes y sus familiares), casi una docena de pacientes (en acuerdo con nosotros y sus médicos locales), han usado Pamidronato empíricamente (solo o con esteroides) para el tratamiento de recaídas, especialmente aquellas que comprometen articulaciones mayores. En 10 de 13 pacientes (77%), hubo mejoría de los síntomas de la recaída de FOP. En tres de los 13 (23%), no se observó mejoría en la apariencia de la lesión tanto para el paciente como para el médico. Interesantemente, no se produjo ningún efecto protector en la ocurrencia de recaídas posteriores en ninguno de los pacientes tratados con dosis única o un curso intravenoso breve de Pamidronato. En consecuencia, cualquier efecto anecdóticamente informado, puede ser transitorio y relacionado solo con la lesión presente al momento de la terapia.

Si bien estos reportes no son válidos científicamente, constituyen un grupo importante de observaciones que sugieren estudios científicos en condiciones controladas en el laboratorio o en la clínica. Los protocolos de tratamiento variaron levemente de paciente a paciente (dependiendo de la edad, peso corporal y sitio de la recaída) pero en general fueron similares. Detalles de tales protocolos usados hasta la fecha se incluirán en las **Guías de Tratamiento de FOP**, actualmente en preparación. Estas se encontrarán en el internet en www.ifopa.org cuando estén completas durante los próximos meses.

Efectos colaterales de las infusiones endovenosas fueron síntomas gripales tales como fiebre, calofríos y dolores musculares. Estos síntomas pueden ser disminuidos con tratamiento previo con acetaminofén. Un paciente desarrolló tetania (contracciones musculares incontrolables debido a bajos niveles de vitamina D en la sangre) y un paciente desarrolló flebitis periférica (inflamación de las venas) en el sitio de la infusión intravenosa que requirió tratamiento hospitalario con antibióticos endovenosos.

Una pregunta importante que surge de estas observaciones en el tratamiento rutinario de FOP es: ‘¿Cuál es la base fisiológica para estos efectos potencialmente beneficios de los aminobisfosfonatos en el tratamiento de recaídas de FOP?’

Como consecuencia de su potente inhibición de la resorción ósea, los aminobisfosfonatos inhiben efectivamente la liberación de factores de crecimiento y morfógenos (tales como BMPs) que son almacenados en la matriz ósea extracelular del esqueleto. La acción de los bifosfonatos en la supresión de la resorción ósea es mucho mayor y más duradera que la de cualquier otra clase de medicamentos, y dura de meses a años. Como consecuencia, si los aminobisfosfonatos inhibiesen las lesiones de FOP disminuyendo la liberación de BMPs secuestradas en el esqueleto, uno esperaría un efecto más pronunciado en la

prevención de recaídas subsecuentes, lo que no se vio en los pacientes tratados. Claramente, si los aminobisfosfonatos son realmente beneficios en el tratamiento de las recaídas de FOP, deben tener un mecanismo de acción que sea muy breve y substancialmente diferente de la inhibición de osteoclastos que constituye el efecto beneficioso de esta medicina en el esqueleto normotrófico.

Si bien el mecanismo potencial de acción de los aminobisfosfonatos en lesiones tempranas de FOP o lesiones tipo-FOP inducidas por BMP está aun indeterminado, dos artículos publicados en 2002 ofrecen algunas explicaciones tentativas. Estos dos artículos, publicados en la literatura científica sobre cáncer, documentan efectos antiangiogénicos extremadamente potentes (disminución de formación de nuevos vasos) de Pamidronato y otros varios aminobisfosfonatos tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, la administración intravenosa de Pamidronato disminuye dramáticamente los niveles de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y de factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) en pacientes con cáncer y con metástasis óseas. Tanto VEGF como bFGF son potentes factores tumorales asociados con angiogénesis.

La angiogénesis es uno de los hallazgos histopatológicos más prominentes en lesiones pre-óseas de FOP y, consecuentemente, un blanco potencial para tratamientos (como se explicó previamente). Además, bFGF es un estimulante extremadamente potente *in vitro* de la angiogénesis que ha sido implicado en el crecimiento de tumores sólidos y de lesiones de FOP. Niveles urinarios de bFGF se encuentran marcadamente elevados en pacientes con FOP especialmente durante recaídas agudas. Mas aun, la expresión de bFGF es muy alta en las células de lesiones de FOP en especímenes biopsiados. Estos datos sugieren fuertemente que bFGF puede ser un marcador bioquímico de actividad de la enfermedad y proveen una base bioquímica para considerar la terapia anti-angiogénica y anti-bFGF en etapas tempranas del proceso patológico. El objetivo de la terapia anti-angiogénica en FOP (sin importar cual medicamento se utilice) es inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos con miras a disminuir o inhibir la producción subsecuente de hueso nuevo una vez ha aparecido una nueva lesión.

El efecto del Pamidronato y otros aminobisfosfonatos en la angiogénesis en ratones fue totalmente inanticipado pero no sorprendente teniendo en cuenta los efectos extraordinariamente potentes de estos medicamentos como terapia adyuvante en el tratamiento de varios cánceres. Los efectos potenciales anti-angiogénicos del Pamidronato en FOP son también compatibles con la vida media corta del medicamento en la circulación que antecede a su deposición estable a largo plazo en el esqueleto y podrían explicar porque esta medicina pueda tener un efecto en lesiones activas pero no en la prevención de nuevas lesiones.

Otros estudios han mostrado además que el Pamidronato intravenoso puede reducir varias subpoblaciones de linfocitos circulantes y esto puede ser responsable de sus efectos colaterales causando síntomas de tipo gripal. Nosotros aun no podemos excluir la posibilidad de un efecto temprano del Pamidronato en la infiltración linfocítica del músculo esquelético en las lesiones de FOP, tanto aquellas inducidas por BMP4 como aquellas de la enfermedad propiamente dicha.

Otros posibles mecanismos de acción del Pamidronato sobre lesiones de FOP incluyen una inhibición directa de la proliferación de una población de células en rápida división. Tal efecto se notó recientemente en un estudio investigando los efectos de los aminobisfosfonatos en células cancerosas *in vitro*. Es ciertamente posible que el Pamidronato tenga un efecto en uno o más tipos celulares en la lesión temprana de FOP.

Finalmente, uno debe considerar la posibilidad de que simplemente no existan efectos positivos del Pamidronato en lesiones de FOP y que los datos observados en los reportes sean debidos a errores observacionales o a simple coincidencia. Únicamente investigaciones rigurosamente controladas *in vitro* e *in vivo* en el laboratorio, así como estudios con control de placebo permitirán decifrar definitivamente estas posibilidades y proveer una base sólida racional para determinar si se debe o no utilizar uno o más de los aminobisfosfonatos en el tratamiento de la FOP.

Estudios de laboratorio para evaluar tanto los efectos terapéuticos beneficios como los mecanismos potenciales de los aminobisfosfonatos en el modelo de osificación heterotópica inducida por BMP así como en el modelo de implantación de células linfoblásticas (discutidos anteriormente en este informe) serán conducidos prontamente. Al mismo tiempo, estamos empezando a diseñar estudios clínicos controlados para evaluar el beneficio potencial de Pamidronato intravenoso en el tratamiento de recaídas agudas de FOP. Este estudio será sometido a numerosas revisiones regulatorias de Comités de Revisión de Investigaciones en la Universidad de Pennsylvania, el Hospital Pediátrico de Philadelphia, la compañía farmacéutica que financia el estudio y la FDA, así como numerosos comités locales de revisión asociados con prácticas privadas donde niños o adultos puedan ser examinados y tratados.

Nosotros estamos completando actualmente un estudio en sus fases I/II en el cual se administrará un tratamiento de Pamidronato intravenoso (o placebo) a pacientes ambulatorios y el paciente será cuidadosamente examinado con cuestionarios diarios a ser diligenciados tanto por los padres como por el médico, así como fotografías diarias de las lesiones y exámenes de sangre ocasionales. Deseáramos diseñar un estudio que pudiese ser realizado en varios sitios lo que permitiría obviar el transporte a Philadelphia. Si bien la logística de tal estudio es difícil, estamos trabajando en él.

Los resultados de tal estudio clínico cuidadosamente controlado nos permitirán casi inmediatamente tener una mejor idea de la eficacia potencial de Pamidronato en el tratamiento de recaídas de FOP. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es extremadamente importante tener observaciones rigurosamente controladas para entender el uso potencial de este medicamento (y otros aminobisfosfonatos) a largo plazo.

Serán Pamidronato y la nueva generación de aminobisfosfonatos una mina de oro en el tratamiento de FOP, o será simplemente “oro falso”? Solo el tiempo y experimentos rigurosos permitirán proveer una respuesta clara a esta pregunta. Mientras la terapia con el gene *noggin* y otras terapias relacionadas tales como el desarrollo de antagonistas del receptor BMP y antagonistas de la vía de la BMP pueden eventualmente probar ser más definitivas en el tratamiento final y la prevención de FOP, esperamos el uso de medicamentos más fácilmente accesibles

tales como glucocorticoides, inhibidores de los leucotrienos, inhibidores de las células mastocíticas, inhibidores de la cox-2 y, tal vez aminobisfosfonatos, nos permitan “ganar tiempo” para pacientes con FOP. Como Jeri Licht, madre de Daniel Licht menciona tan elocuente y pasionadamente en el documental de la BBC

La llave para el esqueleto, “Necesitamos detener el progreso de esta condición y disminuir o frenar la formación de hueso una vez empieza la recaída. Así proveeremos tiempo a los investigadores, y nosotros tendremos el lujo de otorgarles el tiempo que les permita diseñar una cura completa para la condición”.

VII. PRESENTACIONES, REUNIONES, REPORTES Y PUBLICACIONES

Durante 2002, miembros de nuestro laboratorio presentaron conferencias mayores sobre FOP en:

- * Conferencia de Avances en el Metabolismo Mineral de la Sociedad Americana para la Investigación de Hueso y Minerales; Snowmass, Colorado

- * Asociación Americana de Profesionales Afiliados a la Salud; Myrtle Beach, South Carolina

- * Sociedad Americana para Terapia Genética; Boston, Massachusetts

- * Reunión Anual de FOPEv; Valbert, Alemania

- * Facultad de Medicina Baylor; Houston, Texas

- * Fundación de Investigación Bristol Myers-Squibb; Wallingford, Connecticut

- * Facultad de Medicina Cornell; New York City, New York

- * Sociedad Europea de Tejidos Calcificados; Zagreb, Croatia

- * Primer Simposio Internacional de FOP en el Reino Unido; Manchester, Gran

Bretaña

- * Instituto de Ciencias Musculoesqueléticas, Centro Ortopédico Nuffield –

Universidad de Oxford; Oxford, Gran Bretaña

- * Instituto de Medicina Genética – Facultad de Medicina Keck, Universidad del Sur de California; Los Angeles, California

- * Instituto de Miología – Asociación Francesa Contra las Miopatías – Hospital de la Salpêtrière; París, Francia

- * Conferencia Internacional de las Proteínas Morfogénicas del Hueso;

Sacramento, California

- * Fundación de Investigación Johnson & Johnson; New Brunswick, New Jersey

- * Centro Musculoesquelético del Hospital Pediátrico de Philadelphia;

Philadelphia, Pennsylvania

- * Sociedad Ortopédica de Investigación; Dallas, Texas

- * Colegio Real de Cirujanos; Londres, Gran Bretaña

- * Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Arizona; Tucson, Arizona

- * Facultad de Medicina de la Universidad de París; París, Francia

- * Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en San Antonio; San

Antonio, Texas

- * Facultad de Medicina de la Universidad de Zagreb; Zagreb, Croatia

- * Universidad del Estado Wright; Dayton, Ohio

Miembros del laboratorio de FOP presentaron cinco presentaciones mayores sobre FOP en la Sociedad Americana de la Investigacion Mineral y de Huesos (ASBMR) en San Antonio, Texas en Septiembre 2002. Tres de estos articulos fueorn presentados en sesiones plenarias de la reunion, que congreso mas de 6.000 medicos y cientificos de todo el mundo. Como siempre, fue una oportunidad maravillosa para presentar nuestros descubrimientos mayores en FOP y POH a un grupo extraordinariamente grande y distinguido de cientificos y medicos de todo el mundo.

El Centro para Investigacion en FOP y Desordenes Relacionados

Escribiendo para el **Scientist**, el Dr. John Trojanowski, MD, PhD, Director del Instituto de Envejecimiento en la Universidad de Pennsylvania, cito: ‘La mayoría de los problemas biologicos de hoy requieren estrategias de investigacion multidisciplinarias que permitan el uso de metodologias multiples y diversas que ningun investigador puede dominar por si mismo. El beneficio mas tangible del Centro y sus programas puede ser la adquisicion rapida y economica de respuestas a cuestiones biologicas complejas que resultan de la investigacion conducida por investigadores dedicados que trabajan sinérgicamente’. El Centro para Investigacion en FOP y Desordenes Relacionados fue establecido hace varios años gracias a una donacion del Fondo de la Familia Cali con el mismo espíritu.

Durante el año pasado, el Programa de Becas del Centro para la Investigacion de FOP y Desordenes Relacionados financio ocho proyectos mayores en laboratorios afiliados en la Universidad de Pensilvania. Varios de stos proyectos han sido destacados en las secciones previas de este informe y han producido resultados importantes en la investigacion en FOP. Ellos incluyen trabajos en la identificacion definitiva de celulas blanco en osificacion heterotopica inducida por BMP, caracterizacion del papel de la angiogenesis en dos fases criticas de la esqueletogenesis y el papel potencial de agentes anti-angiogenicos en modular tales efectos, trabajo en el desarrollo de nuevos vectores virales asociados al adenovirus para el uso de experimentos con terapia noggin, el papel del factor de crecimiento de los fibroblastos en la via se señalizacion antagonista de BMP, el papel de las celulas de la cresta neural en la osteogenesis, el papel de los glucocorticoides en modular la respuesta de antagonistas de BMP en respuesta a niveles ambientales de BMP, el uso de estudios de microensayos de expresion genetica en determinar la respuesta de los condrocitos a señales apoptoticas estimuladas por fluoroquinolona en los condrocitos, el desarrollo de el pez zebra como un modelo animal vertebrado viable de FOP. Tenemos la fortuna de contar con un grupo talentoso de investigadores y colaboradores trabajando con nosotros en la Universidad de Pensilvania y estamos encantados con los progresos y promesas que este programa unico ofrece.

El Manejo Medico de FOP – en el Internet

En Julio del 2001 publicamos la primera edicion completa de **El Manejo Medico de Fibrodisplasia Ossificans Progresiva (FOP): Consideraciones Terapeuticas Actuales**. Este documento ha sido destribuido a todos los miembros de la IFOPA y a miles de medicos y familiares a todo el mundo. El documento se encuentra en el sitio del

Internet de la IFOPA (www.ifopa.org) y es facilmente accesible par cualquier persona interesada. Gracias a la ayuda desinteresada de varos amigos y traductores, el documento actualmente se encuentra traducido a varias lenguas incluyendo Ingles, Español, Frances, Portugues y Polaco. Este importante documento sera acutalizado este año.

Articulos en prensa

En 2002, publicamos seis articulos sobre FOP y POH en la literatura cientifica. Para 2003, ya tenemos cinco articulos en prensa en literatura cientifica y tres fueron recientemente sometidos para revision. Varios otros estan en preparacion y muchos mas seran generados!

VIII. SU LABORATORIO DE FOP

Si bien el cor del laboratorio de FOP ocupa aproximadamente 2000 pies cuadrados de espacio, nuestras paredes se han expandido durante los tres años pasados con el establecimiento del Proyecto para las Becas de Desarrollo y la maravillosa colaboracion de colegas en muchos departamentos a traves de la Universidad de Pennsylvania. Fotos de nuestros niños con FOP y POH adornan los corredores de nuestro laboratorio central y son un recuerdo constante de nuestros objetivos y nuestra mision. Como decimos a los niños y adultos quienes visitan nuestro laboratorio, ‘Este es realmente **su** laboratorio’. Nos encanta cuando Uds. vienen a visitarnos.

Durante el 2002, el personal del Laboratorio Central de Investigacion en FOP incluyo 17 investigadores: tres investigadores principales, cinco investigadores especializados, cuatro estudiantes post-doctorales, dos estudiantes graduados, un estudiante de medicina y dos estudiantes de pre-medicina. Ademas, cinco estudiantes de pre-grado universitario (college) trabajaron en proyectos de FOP en el laboratorio durante el verano del 2002.

IX. AGRADECIMIENTOS

En la guerra contra la FOP, todos estamos comprometidos en una gran batalla. El campo de batalla per se es pequeño, pero las consecuencias para nuestra comunidad son inmensas, y las consecuencias para el mundo mas amplio de aquellos quienes sufren aflicciones mas comunes del esqueleto no deben ser subestimadas.

Estos son tiempos de esperanza en nuestra batalla contra la FOP. Estamos agradecidos por el progreso dramatico que hemos logrado. Estamos orgullosos por el hecho de que importantes descubrimientos realizados en el laboratorio central de FOP y laboratorios colaboradores estan siendo traducidos a protocolos clinicos y estudios piloto que pueden ser probados con precision cientifica. Cuando encontremos la cura, ganaremos la batalla. Hasta entoces, pelearemos la guerra en todos sus frentes. No nos cansaremos, no retrocederemos, no renunciaremos.

Como hemos mencionado muchas veces anteriormente, causa y cura son dos palabras que nos motivan y proveen los principios guias para nuestra tarea: descubrir la causa

genetica y molecular exacta de FOP y utilizar tal conocimiento para desarrollar tratamientos efectivos y una cura para la enfermedad. Nuestro trabajo continua con focos precisos. Creemos que gran parte de nuestros logros hasta la fecha se debe precisamente a nuestra persistencia en permanecer enfocados en nuestros objetivos.

En resumen, 2002 fue un gran año para desarrollos mayores en la investigacion en FOP, marcado por descubrimientos importantes en la señalizacoin de disregulacion del receptor BMP en FOP, la iniciacion de experimentos potentes de microensayo en FOP, la identificacion definitiva de celulas madre de musculo esqueletico tanto de lineas musculares como vasculares que produces osificacion heterotopica inducida por BMP, por el desarrollo de nuevos modelos animales para FOP, por la identificacion de nuevas medicinas potenciales y blancos potenciales para tales medicinas y por el desarrollo de sistemas virales de administracion mas potentes y efectivos para la terapia noggin en FOP. Queda aun mucho trabajo por hacer. Tenemos la esperanza que el 2003 sera un año de realizaciones aun mayores en la investigacion de FOP.

La comunidad de FOP ha atravezado yn camino dificil y largo durante los pasados 12 años, pero es increíble reconocer que tan lejos hemos llegado. Continamos siendo, de hecho, una comunidad real y vibrante que cubre todo el globo terraqueo. Estamos unidos en nuestros esfuerzos y tenemos el momentum y la vitalidad para lograr nuestros objetivos. Cada dia nos recuerda aun tenemos un largo camino para alcanzar nuestras metas pero nos sentimos reforzados por nuestros logros y energizados frente a nuestros retos.

Como siempre, nuestros agradecimientos de todo corazon van para los niños, adultos y familias que viven con FOP a cada momento de sus vidas. Su ecuanimidad y nobleza nos provee de una inspiracion perpetua que dignifica nuestro trabajo y a todos aquellos quienes tenemos el privilegio de participar en el.

El proyecto de Investigacion Colaborativa en FOP surgio del deseo mutuo de establecer la causa y encontrar la cura final para esta condicion incapacitante. Lo lograremos y triunfaremos. Como siempre, encontrar la cura para FOP no es nuestro trabajo, es nuestra mision.

Todos nosotros en el Laboratorio Central de FOP, en el Programa de Becas para el Desarrollo y en los programas colaborativos en todo el mundo estamos tremendamente orgullosos de ser parte de esta mision y estaos enormemente agradecidos a todos aquellos quienes soportan estos esfuerzos vitales de investigacion:

- * La Asociacion Internacional de FOP (IFOPA)
- * El Instituto Nacional de Salud (El Pueblo de los Estados Unidos de America)
- * El centro para Investigacion en FOP y Desordenes relacionados
- * El Fondo de la Familia Cali para la Investigacion en FOP
- * El Fondo de la Familia Weldon para la Investigacion en FOP
- * El Fondo Isaac y Rose Nassau para Profesores en Medicina Molecular

Ortopedica

- * El Fondo de Becas Allison Weiss en Medicina Molecular Ortopedica

- * El Fondo de Becas en Memoria de Stephen Roach
- * La Fundacion Roemex
- * La Fundacion Grapian
- * La Asociacion de Heteroplasia Osea Progresiva
- * La Fundacon Hartford
- * El Consejo de Investigacion Medica y la Universidad de Oxford (Gran Bretaña)
- * La Asociacion Francesa contra las Miopatias (Francia)
- * Miembros del Consortium Internacional para la Invstigacion en FOP
- * Genaera Farmaceuticos
- * Johnson & Johnson, Inc.
- * Regeneron Farmaceuticos
- * La gente de Santa Maria (10 años de extraordinario servicio)
- * Y los muchos individuos, familias, amigos a traves de todo el mundo quienes contribuyen generosamente y sin cansancio al esfuerzo en FOP.

FOP continua siendo uno de los problemas mas perplejos, dificiles y llenos de obstaculos de la condicion humana. Hemos dicho a menudo que si fuese tan comun como la distrofia muscular o el cancer, miles de cientificos y miles de laboratorios en todo el mundo estarian trabajando para resolver el misterio de FOP. A pesar de su rareza, creemos la investigacion en FOP es la llave para entender no solo FOP sino muchas condiciones mucho mas comunes que afectan el esqueleto humano. Es fundamentalmente, la llave del esqueleto.

Gracias, como siempre, por su continuo soporte generoso y calido en este esfuerzo vital.