



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION
ESPECIALIDAD EN:
GENÉTICA MÉDICA

*ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN ACVR1 EN UN GRUPO DE
PACIENTES MEXICANOS CON FIBRODISPLASIA OSIFICANTE
PROGRESIVA*

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
MEDICO ESPECIALISTA EN:

GENETICA MEDICA

P R E S E N T A:

DRA. LETICIA FLORES GALLEGOS

PROFESOR TITULAR
DRA. EN C. MARGARITA VALDÉS FLORES

ASESORES: DRA EN C. MARGARITA VALDÉS FLORES
DRA EN C. LEONORA CASAS ÁVILA



MEXICO, D.F.

FEBRERO DE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DRA. MATILDE L. ENRIQUEZ SANDOVAL
DIRECTORA DE ENSEÑANZA

DRA. XOCHIQETZAL HERNÁNDEZ LÓPEZ
SUBDIRECTORA DE POSTGRADO
Y EDUCACIÓN CONTINUA

DR. LUIS GÓMEZ VELÁZQUEZ
JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA

DRA. EN C. MARGARITA VALDÉS FLORES
PROFESOR TITULAR

DRA. EN C. MARGARITA VALDÉS FLORES
ASESOR CLÍNICO

DR EN C. LEONORA CASAS ÁVILA
ASESOR METODOLÓGICO

A mis pacientes: los pasados, presentes y futuros...

A mi familia, eje de crecimiento

AGRADECIMIENTOS

A MIS PROFESORES:

Dra. Margarita Valdés Flores, Dr. Norberto Leyva García

Por su apoyo y dedicación durante estos años de residencia

Dr. Antonio Miranda Duarte, Dra. María de la Luz Arenas Sordo

Por sus enseñanzas en todos los aspectos de mi vida.....

Dra. Leonora Casas Ávila y Dra. Valeria Ponce de León Suárez

Por su incondicional apoyo en toda esta travesía, por el interés en mi proyecto y las tardes trabajando hasta tarde

A la Dra. en C. Lucía Taja Chayev del Instituto Nacional de Cancerología

Al Dr. Luis Daniel Campos medico genetista del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la ciudad de Monterrey

Al Dr. en C. Guillermo Pérez García Jefe de Servicio de Genética del hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”

Por su apoyo y participación en este proyecto

Al Dr. Federico Osorio Antonio y a todas las personas que estuvieron a mi lado.

La Genética no puede ser por más tiempo una ciencia esotérica, la genética nos atañe a todos: versa sobre la vida y la muerte, sobre el significado y la respuesta a la incapacidad física, y sobre los nuevos dilemas morales creados por nuestro creciente conocimiento

Alan F. Wright & A. Christopher Boyd

INDICE

Resumen.....	8
Antecedentes, definición y epidemiología.....	9
Características clínicas.....	12
Historia natural de la enfermedad.....	15
Diagnósticos diferenciales.....	17
Diagnóstico.....	18
Características histológicas.....	19
Bases moleculares de la enfermedad.....	23
Correlación genotipo-fenotipo.....	31
Tratamiento.....	32
Planteamiento del Problema y Justificación.....	34
Objetivos.....	35
Material y Método.....	35
Resultados.....	40
Discusión.....	49
Conclusiones.....	54
Bibliografía.....	55
Anexo 1.....	59
Anexo 2	64

RESUMEN

La Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP) que se caracteriza por osificación heterotópica progresiva es una enfermedad autosómica dominante con prevalencia de ≈ 1 caso cada dos millones de habitantes. A pesar de su rareza es importante conocer sus características clínicas principales para establecer un diagnóstico temprano y evitar así sus complicaciones o el uso de métodos invasivos que pudieran comprometer la calidad de vida de los pacientes. El gen relacionado con esta enfermedad se conoce con el nombre de gen ACVR1 y la mutación más común es (617G>A).

Objetivo: analizar molecularmente un grupo de pacientes mexicanos con diagnóstico clínico y radiológico de FOP mediante la técnica de secuenciación.

Material y métodos: Se analizaron 6 pacientes con FOP, entre ellos un caso de presentación familiar. Particularmente se investigó la mutación 617 G>A.

Resultados y conclusión: Se encontró la mutación 617 G>A en forma heterocigota en 5 de 6 pacientes (86%), estos mostraron un fenotipo clásico de FOP. El último paciente no mostró la mutación, sin embargo fue enviado con el diagnóstico clínico por lo que deberá estudiarse más a fondo desde el punto de vista molecular. Se corroboran datos clínicos y moleculares reportados en la bibliografía consultada y se estandarizó la técnica para buscar la mutación en pacientes mexicanos.

ANTECEDENTES, DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

“Entonces la mujer de Lot miró atrás, a espaldas de él, y se volvió estatua de sal”

La Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP) también conocida como “deformidad del hombre de piedra” se caracteriza por osificación heterotópica progresiva. Esta entidad es una de las enfermedades genéticas más catastróficas en el ser humano cuyo origen probablemente data desde la época antes de Cristo, de acuerdo al pasaje bíblico del libro de Génesis: La esposa de Lot (Génesis 19:1-26) (9,14). Sin embargo, es gracias a Guy Patin, médico y escritor francés (quien en 1648 publicó una carta titulada “*La mujer que se convirtió en madera*”) y es gracias a Bauer y Bode (1,3) (quienes en el año de 1800 describieron la enfermedad), que actualmente conocemos la enfermedad como una entidad nosológica independiente.

En los últimos años, como consecuencia de los avances de la biología molecular, se ha logrado identificar el defecto genético responsable de la enfermedad(12). Este conocimiento nos permite la búsqueda de nuevos métodos terapéuticos para esta enfermedad discapacitante.

La **Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP)**, previamente conocida como *Miositis Osificante Progresiva* o *Enfermedad de Münchmeyer* (7), se describe en la actualidad como una enfermedad genética, rara, de herencia autosómica dominante, con penetrancia completa y expresividad variable.

La tasa de prevalencia que se conoce es de ≈ 1 caso en cada 2 millones de habitantes aproximadamente, con una baja tasa reproductiva, sin predilección racial o étnica (10,11). En nuestra población no existen datos epidemiológicos al respecto.

Los principales grupos de investigación clínica en esta enfermedad, determinaron por medio del análisis minucioso de historias clínicas y descripciones morfológicas de pacientes con sospecha de FOP, que la enfermedad consta de dos características clínicas clásicas: a) *malformaciones congénitas de los primeros orfejos* y b) *osificación heterotópica progresiva* (1,3,11,10). Por tanto, para el diagnóstico inicial de la enfermedad surge la siguiente premisa clínica: “todo neonato con malformación congénita de primeros orfejos tiene Fibrodisplasia Osificante Progresiva hasta no demostrar lo contrario”.

La tabla 1 resume las principales series clínicas descriptivas encontradas durante la revisión bibliográfica de este trabajo, resaltando las características más importantes de la enfermedad.

Tabla 1. Series clínicas

Autor	Connor y Evans	Cohen y Hahn	Kaplan	Kaplan y cols	Bocciardi y cols.	Kaplan y cols.
Referencia bibliográfica	The Journal of Bone and Joint Surgery. 1982. Vol 64-B, No 1.	The Journal of Bone and Joint Surgery. Vol 75*, No2 February 1993	The Journal of bone and Joint surgery. Vol 75-A, No 8 August 1993	PEDIATRICS, Volume 121 No 5, May 2008	European Journal of Human Genetics (2009), 17, 311-318.	Human Mutation, Vol 30, No 3, 379-390, 2009
País	Inglaterra	E.U.A.	E.U.A.	E.U.A	Italia	E. U. A
Número de pacientes	34	44	4 caso familiar	7	17	112
Promedio en años de edad	28.7	3	8.8	3	26.2	8.2
Promedio en años edad de inicio	3	5 +/-4	1.5	ND	2-5	8.2
Hallazgos clínicos básicos	M.P.O X O.H X	M.P.O X O.H X	M.P.O X O.H X	M.P.O X O.H	M.P.O X O.H X	M.P.O X O.H X
Otros hallazgos clínicos y radiográficos comunes y atípicos	Clinodactilia, pulgares cortos, defectos transversos, retraso mental, calvicie, hipoacusia, subluxación atlanto-axial, hipoacusia		clinodactilia bilateral, escoliosis	Malformaciones vertebrales Osteocondroma de tibia	Cuello femoral corto y ensanchado, fusiones cervicales. Osteocondromas de tibia proximal	Hipoacusia, malformación cervical, cuello femoral corto y ensanchado, malformaciones de pulgares, cambios en primeros orjejos, calvicie. Ausencia de pulgar, malformaciones en dedos, cataratas, glaucoma, craneofaringioma, hipospadias, anemia aplásica, malformaciones cerebrales cavemosas
Análisis molecular	No se realizó	No se realizó	No se realizó	En 100% se encontró c817 G>A	c817 G>A c.774 G>C (2 pacientes)	c817 G>A (90 pacientes) c.619 C>G (1 paciente) c.982 G>A (5 pacientes) c.983 G>A (2 pacientes) c.1067 G>A (4 pacientes) c.1124 G>C (1 paciente) c.590-592 delCTT (1 paciente)

Nota: M.P.O = malformaciones de primeros orjejos, O.H.= osificación heterotópica, ND= dato no disponible

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Dos características clínicas principales enmarcan el espectro clínico de la enfermedad: a) *malformaciones congénitas de los primeros orfejos* y b) *osificación heterotópica*. Sin embargo, se han encontrado otras malformaciones congénitas que parecen encontrarse en la gran mayoría de estos pacientes razón por la cual cualquier médico que se enfrente a esta sospecha diagnóstica, estará obligado a identificar.

La *figura 1* muestra los dos componentes más importantes para integrar el diagnóstico de FOP.

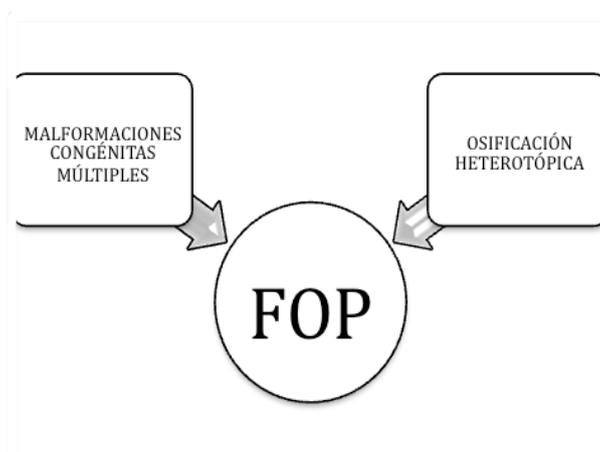


Figura 1

La malformación congénita de los primeros orfejos (*Figura 2*) puede deberse a la presencia de monofalange, a la fusión interfalángica, o bien, a la ausencia del primer orfejo; siendo la primera causa la de mayor prevalencia ⁽¹⁾. En los dos primeros casos hay apariencia de *hallux valgus congénito* que a pesar de

su evidencia clínica, pasa desapercibido con gran frecuencia por los médicos que tienen el primer contacto con el paciente; retrasando así el diagnóstico y aumentando las posibilidades de eventos adversos.



Figura 2: Malformación congénita de primeros orfejos, Kaplan et al, 2008 (21)

Conocer los sitios predilectos, así como el orden en que aparecen los brotes inflamatorios (*Figura 3*) con su consecuente osificación, facilitan al médico el diagnóstico correcto. Macro y microscópicamente el hueso formado es *lamelar*, morfológicamente indistinguible de cualquier otro de su misma clase (5). Este hueso intenta formar un “segundo esqueleto” sobre tejido no destinado para ello.



Figura 3: Osificación heterotópica típica, Kaplan et al 2008(16).

Otras asociaciones clínicas en los pacientes clásicamente afectados son: malformaciones de pulgares, clinodactilia del 5º dedo bilateral, hipoacusia de tipo conductiva (50% de los pacientes) o bien de tipo neurosensorial de inicio en la infancia o adolescencia, amenorrea primaria, calvicie con fragilidad y adelgazamiento capilar, fusión de vértebras cervicales con estrechamiento de cuerpos vertebrales, cuellos femorales cortos y con ensanchamiento transversal, así como osteocondromas de tibia proximal. La nefrolitiasis es un hallazgo común en los pacientes adultos (1, 15).

Las *figuras 4, 5 y 6* muestran los hallazgos radiológicos más frecuentemente encontrados en los pacientes con FOP (21).



Figura 4: Fusión cervical

Figura 5: Cuello femoral corto y ensanchado

Figura 6: Osteocondromas de tibia

Gracias a la identificación de un mayor número de pacientes, se ha documentado la variabilidad fenotípica, logrando así establecer una correlación genotipo-fenotipo (21). El espectro fenotípico puede ser variable y se pueden presentar desde manifestaciones clínicas y radiológicas clásicas hasta características aparentemente no relacionadas con la enfermedad, encontrando incluso afección en órganos y tejidos no involucrados comúnmente, como pueden ser: anemia aplásica, displasia fibrosa poliostótica,

craneofaringioma, glaucoma, úvula bífida, convulsiones o retraso en el desarrollo, entre otras (21).

En conclusión, debido a la variabilidad en el patrón de presentación, los pacientes pueden agruparse en tres grupos: “FOP clásico”, “FOP-Plus” y “variante FOP” (21).

HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

A partir del año 1918, numerosas series de pacientes con FOP han sido publicadas, permitiendo así conocer la historia natural de la enfermedad (1).

La entidad se manifiesta desde el nacimiento con malformaciones congénitas de los primeros ortejos y otras malformaciones múltiples asociadas. De los 2 a los 5 años de edad se presentan brotes inflamatorios en tejido conjuntivo (músculo esquelético, ligamentos y tendones) que progresan en sentido distal y que con el paso del tiempo se convierten en hueso maduro, esta formación de hueso es episódica, pero la incapacidad que genera es progresiva (1,9,10,15).

La aparición de los brotes se observa inicialmente en la región craneal y en la región torácica dorsal, posteriormente, progresa en sentido ventral, caudal y apendicular recapitulando los eventos del desarrollo de la morfogénesis embrionaria (2,15). La anquilosis de las articulaciones mayores limita el movimiento con la consecuente incapacidad funcional del paciente.

La articulación temporo-mandibular (ATM) es la última articulación involucrada pero afecta al 70% de los pacientes, limitando con esto su expectativa de vida por interferir con la capacidad de masticación (16).

Los músculos liso, cardíaco y extraoculares incluyendo la lengua nunca se ven comprometidos durante el proceso fisiopatológico osificante de la enfermedad (7, 15).

Los brotes inflamatorios pueden ocurrir esporádicamente, o bien, de forma secundaria a un evento traumático menor en tejido conjuntivo. Las inyecciones intramusculares, el tratamiento ortodóntico invasivo y las infecciones virales pueden acelerar la aparición de brotes con potencial de osificación. (1, 15).

En estadios finales, los pacientes se encuentran postrados en una silla de ruedas entre los 30 y 45 años de edad, con severa limitación del movimiento. La muerte ocurre principalmente por falla cardiorrespiratoria, por infección pulmonar a consecuencia de la restricción de la caja torácica, por caídas debido a incoordinación motriz, o bien por desnutrición a causa de la anquilosis temporo-mandibular (ATM) lo cual limita su apertura (1,6, 10,15, 32).

Debido a la falta de acuciosidad clínica, el diagnóstico rara vez se realiza durante una primera exploración física o durante el primer contacto médico. Generalmente el paciente acude en diferentes ocasiones a múltiples servicios hospitalarios y recurre a médicos generales y diferentes especialistas antes de

que pueda realizarse un diagnóstico certero al igual que un manejo adecuado incluyendo el asesoramiento genético correspondiente (10).

El tiempo promedio en el cual se define el diagnóstico correcto oscila entre 3.1 y 4.1 años y la edad promedio del paciente en este momento es de 5.7 años (1,10). Entre los primeros diagnósticos de sospecha se encuentran: sarcomas, fibromatosis juvenil agresiva, tumor desmoide, linfedema, síndrome de Klippel-Feil, miositis osificante postraumática, dermatomiositis y heteroplasia ósea progresiva (1, 6,7, 10, 15) .

Los errores en el diagnóstico afectan a cerca del 50% de los pacientes (16); estos errores o bien el retraso en el diagnóstico pueden incrementar la morbilidad y mortalidad de los pacientes, debido a la toma de estudios innecesarios o bien debido a procedimientos quirúrgicos no justificados que pueden causar un daño irreversible.

DIAGNÓSTICOS DIFERENCIALES

El diagnóstico diferencial más importante debe ser la Heteroplasia Ósea Progresiva (HOP) la cual se caracteriza también por formación extensiva de hueso en tejido conjuntivo, sin embargo no presenta las malformaciones congénitas de primeros orfejos clásicas de la FOP. La osificación inicia en dermis progresando hasta tejido conjuntivo y en algunas ocasiones se fusiona con el hueso (20).

Esta HOP es una enfermedad autosómica dominante, relacionada con defectos en el gen GNAS el cual se localiza en 20q13.2.^(20,38).

Deben considerarse también los siguientes diagnósticos diferenciales: miositis osificante postraumática, sarcomas, fibromatosis juvenil agresiva y síndrome de Klippel-Feil.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de este desorden es esencialmente clínico y radiológico, no podrá ser realizado sin la sospecha médica de ahí la importancia del conocimiento de la enfermedad. En cualquier neonato o infante con malformaciones congénitas de los primeros orjejos debe sospecharse siempre Fibrodisplasia Osificante Progresiva.

No obstante se deben buscar las malformaciones congénitas asociadas antes mencionadas incluso antes de la aparición de los brotes inflamatorios o de la osificación heterotópica. Puede solicitarse un perfil óseo en sangre, como estudio de laboratorio en el que se espera una *fosfatasa alcalina* elevada ⁽¹⁶⁾.

Estudios de imagen entre los que se encuentran radiografías o tomografía computada deben ser solicitados con la finalidad de corroborar el diagnóstico e identificar datos de osificación no manifestada clínicamente. La resonancia magnética o el ultrasonido han probado ser de poca utilidad ⁽¹⁰⁾.

Las biopsias de músculo así como cualquier otro método invasivo están contraindicados. Cerca del 67% de los pacientes en fase de diagnóstico son sometidos incorrectamente a toma de biopsia, lo cual acelera el curso de la enfermedad ⁽¹⁰⁾.

De ser posible debe realizarse el estudio molecular, buscando en primer lugar la mutación reportada en la mayoría de los pacientes (ACVR1 617 G>A) y si existen los recursos suficientes, debe realizarse secuenciación completa del gen ACVR1 en búsqueda de otras mutaciones poco comunes en este gen.

Es importante señalar que la presencia de la mutación aunada a la malformación de los orjejos con o sin de la evidencia de osificación heterotópica evita la realización de métodos invasivos innecesarios ⁽¹⁶⁾.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

A pesar de la contraindicación de la biopsia, ésta ha sido de gran utilidad en la caracterización histológica de la enfermedad, la cual ha sido el cimiento de la investigación molecular.

En 1998, Gannon y colaboradores encontraron que a nivel de tejido músculo-esquelético existen lesiones fibroproliferativas altamente angiogénicas, así como infiltrado linfocítico perivascular de células T y B (indistinguibles en esta

fase de la fibromatosis agresiva juvenil). Horas después del brote inicial, las lesiones se distribuyen y evolucionan hacia un proceso de osificación endocondral para formar hueso lamelar maduro. Se identificó también una sobreproducción de BMP4 y de FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) (4,5).

El aumento de volumen y el edema muscular progresivo así como la fibroproliferación y la angiogénesis características de la enfermedad, sugieren la presencia de mediadores de la inflamación entre los que se encontraron como principales candidatos a los mastocitos (5). Esta migración de células mononucleares preceden a la mionecrosis. El tejido fibroproliferativo progresa a una condensación cartilaginosa avascular seguida de una revascularización y de osteogénesis (15).

Los mastocitos son células de origen hematopoyético (CD34) que se desarrollan de células madres pluripotenciales que viajan por el torrente sanguíneo como células indiferenciadas y que se distribuyen en numerosos tejidos, donde se lleva a cabo su maduración. Se encuentran en la proximidad de los vasos sanguíneos y nervios distribuidos en el tejido conjuntivo.

El citoplasma de los mastocitos contiene gránulos metacromáticos cuyo contenido incluye histamina, heparina, péptido proangiogénico y matriz extracelular, así como metaloproteinasas, hidrolasas y catepsinas que les permiten participar en procesos fisiológicos, neurogénicos, inflamatorios, inmunomoduladores, angiogénicos y remodeladores (5).

En el año 2000, Gannon y colaboradores realizaron el primer modelo fisiopatológico de FOP estratificando histológicamente las lesiones en: 1A, 1B, 2A, 2B, 1C y 2C, con las siguientes características ⁽⁵⁾:

- a. 1 A → Infiltrado linfocítico perivascular antes de la invasión a tejido muscular, los mastocitos son 10 veces más abundantes que en los controles.
- b. 1B → Migración de linfocitos T a músculo adyacente e incremento de concentración de mastocitos que migran del intersticio del tejido conjuntivo.
- c. 1C → Aparición de tejido fibroproliferativo vascular que rodea e invade al músculo contiguo, los mastocitos se encuentran 40 a 150 veces más abundantes de lo normal.
- d. 2A → Lesión edematosa y altamente vascular abundante en mastocitos que rodean la periferia de la lesión.
- e. 2B → Primera aparición de cartílago, los mastocitos se encuentran confinados a la pseudocápsula fibrosa que lo rodea.
- f. 2C → Lesión madura con osificación endocondral, los mastocitos se encuentran en la periferia de la lesión en una densidad similar al de la lesión 1A; en este momento no existen residuos histológicos de músculo ya que ha sido reemplazado por hueso.

Semejanzas Embriológicas

Las primeras observaciones sobre la anatomía, temporalidad y espacio, de la osificación heterotópica en los pacientes con FOP, levantó la sospecha de que ésta no era al azar. Este “segundo esqueleto” recapitula el evento embriológico responsable de la formación del esqueleto, clave importante para la búsqueda de la alteración molecular.

El sistema esquelético se desarrolla a partir del mesodermo y de las células de la cresta neural. La condensación de éstos marca el inicio de la diferenciación formando centros de condricificación, seguida por reemplazo de cartílago por tejido óseo (4, 34).

El hueso se desarrolla a partir del mesénquima, el cual se condensa y vasculariza diferenciando células troncales a osteoblastos, que depositan tejido osteoide. Los osteoblastos quedan atrapados en la matriz, transformándose en osteocitos (células formadoras de hueso) (34).

Existen dos tipos de osificación: a) *intramembranosa*, que se encarga de la formación de huesos planos y b) *endocondral*, que forma el resto del esqueleto y por tanto, responsable de la osificación en los pacientes con FOP (34).

BASES MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD

En la FOP los estudios moleculares de los casos familiares han sido de gran utilidad al igual que los estudios anatomopatológicos de tal forma que en el año 2006, *Shore y cols.* descubrieron el gen responsable de este desorden (12).

Inicialmente se buscó la sobre-expresión de BMP4 (14q 22-q23) en líneas celulares linfoblastoides, sin embargo, los resultados fueron poco alentadores. Posteriormente el gen NOG (17q22) el cual inactiva a BMP4 fue el siguiente gen candidato sin resultados concluyentes (5,9,12).

En el año 2000 Feldman y colaboradores, mediante un “*screening*” genómico, relacionaron a la región 4q27-31 como sitio candidato dentro del cual se localizan los genes SMAD1, IL-15 así como el gen codificante para el receptor de proteína morfogenética de hueso tipo IB (BMPR1B); los cuales se consideraron como posibles genes responsables de la enfermedad ya que se encuentran involucrados en la vía de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP); sin embargo, no se identificó ninguna mutación en esta región (4,12).

El análisis de nuevos casos familiares hizo posible la exclusión de los genes ya señalados y permitieron identificar otra nueva región en 2q23-24, en la que se encuentra el gen ACVR1 conocido también como ALK2, el cual es un receptor que participa en la vía de señalización de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP), y que se expresa en varios tejidos incluyendo músculo esquelético y condrocitos. Su activación aumenta la expresión de BMP4 y disminuye la de los antagonistas de BMP, entre los que se incluyen NOG;

además de que induce condrogénesis ectópica y estimula la fusión de las articulaciones (12,13).

ACVR1 es un receptor de activina A tipo 1 con actividad de cinasa de serina/treonina, perteneciente a la familia del factor de crecimiento β (TGFB β) que se compone de 7 receptores, entre los que se incluyen ALK 1 al 7 y que junto con los receptores tipo II (BMPRII) forman un complejo heterotetramérico en la membrana celular. ALK1/ACVRL1, ALK2/ACVR1, ALK3/BMPRI-IA y ALK6/BMPRI funcionan como receptores tipo I(21,24).

Ambos receptores (I y II) tienen un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana y uno citoplasmático con actividad de cinasa de serina/treonina. Los receptores tipo I se diferencian porque contienen un dominio regulatorio altamente conservado, que se conoce como GS por su secuencia conservada rica en glicina/serina (21).

El dominio GS ayuda a mantener inactivo al receptor previniendo así su activación constitutiva. Además de ser un sitio crítico de unión y fosforilación de las proteínas de señalización SMAD específicas. Este interactúa además con la proteína 12 de unión a FK506 (FKBP1A o FKBP12) (12, 21).

El gen FKBP1A pertenece a la familia de las inmunofilinas y participa en el metabolismo del hueso induciendo la osteogénesis y estabilizando la conformación inactiva de ACVR1 mediante su unión al dominio GS, previniendo así su activación en ausencia de ligando (12,21,23). Funciona también reclutando al complejo SMAD/SMURF1 cuya función es la ubiquitinación, internalización y degradación de todos los receptores tipo I. Por lo tanto,

FBKP1A tiene dos funciones: regular el estado inactivo del receptor y mantener una concentración adecuada de receptores tipo I en la membrana celular (23).

En la *figura 7* se muestra el ideograma con la localización del gen y las estructuras de la proteína.

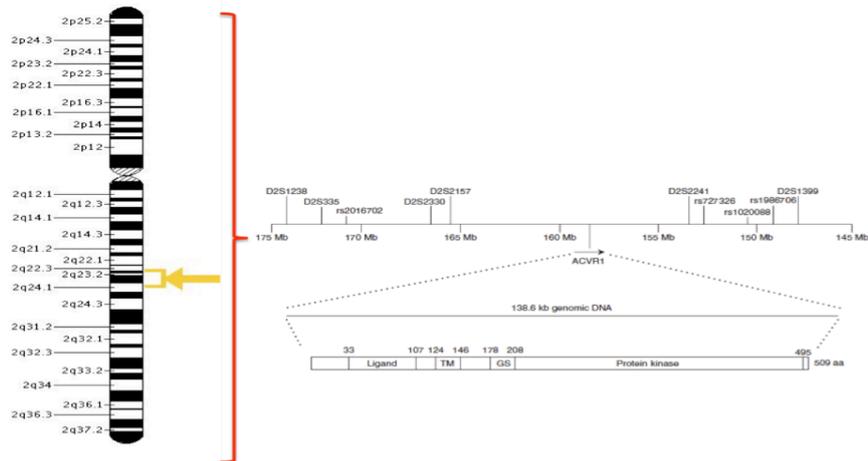


Figura 7 (12, 38)

Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) son una superfamilia altamente conservada de factores de crecimiento transformante β ; son moléculas de señalización extracelular, cuya función es regular el destino de las células progenitoras jugando así un papel crítico en la embriología y en la vida post-natal. Actúan a través de una vía de señalización compleja que inicia con la unión a los receptores y transmitiendo sus señales a través de las vías de señalización SMAD y MAPK (Cinasa de Proteína Mitógeno Activada) con la finalidad de regular la transcripción nuclear de genes “blanco” que responden a BMP (14, 17, 20, 23). SMAD y MAPK se encuentran desregulados en células de pacientes con FOP (14, 17, 20, 23).

La señal de BMP se traduce por dos tipos de receptores (I y II). El tipo II de unión a ligando activa al tipo I a través de la fosforilación del dominio GS formando un complejo tetramérico que se internaliza para fosforilar a proteínas de la familia SMAD, corriente abajo en la cascada (17, 21, 24).

Las proteínas SMAD se expresan durante todo el proceso de condrogénesis. SMAD 1, SMAD 5 y SMAD 8, son reguladas por receptores (28), activan la señal de BMP y forman un complejo junto con SMAD4, el cual se transloca a núcleo, uniéndose al DNA y activando la transcripción de sus genes “blanco” (21, 41).

SMAD 6 y SMAD 7 (I-Smad), son inhibidores competitivos del activador del grupo SMAD. Los sistemas de señales de este tipo son importantes en el desarrollo embrionario temprano ya que llevan al desarrollo de tejidos específicos (21, 24, 41).

Por otro lado la vía MAPK también se ve involucrada, las células de pacientes con FOP muestran una hiperfosforilación de MAPK así como un aumento de la expresión de los genes “blanco” de BMP's (20). La *figura 8* muestra la vía de señalización de estas proteínas morfogenéticas de hueso:

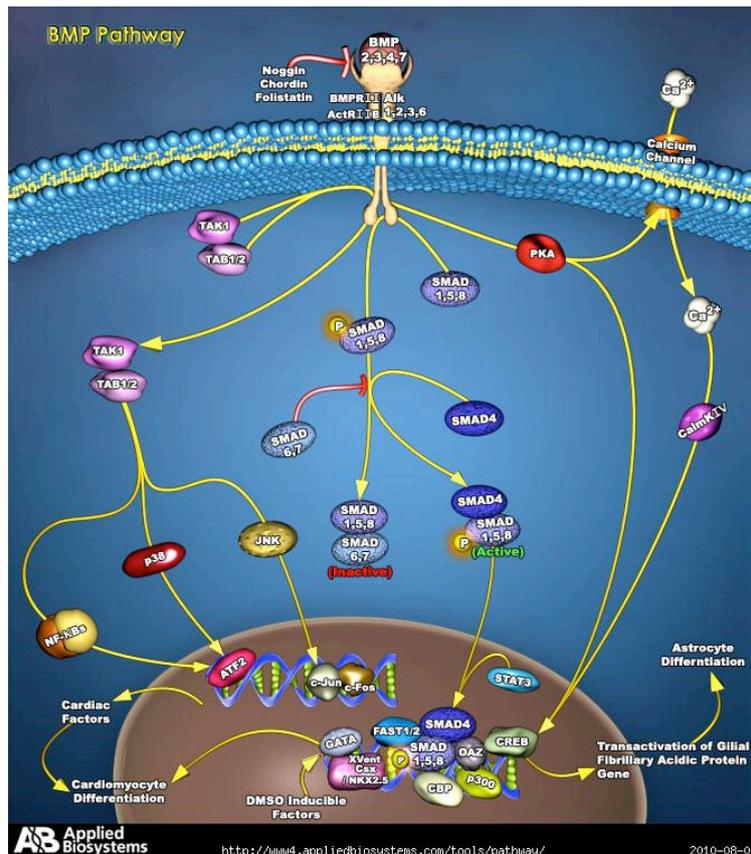


Figura 8: Señalización de BMP (39)

Estudios moleculares del gen ACVR1 en casos familiares y esporádicos de pacientes con FOP, mostró la presencia de un cambio heterocigoto en la posición 617 del cDNA, el cambio fue la sustitución de una Guanina por una Adenina⁽¹²⁾. La activación constitutiva de ACVR1 es la causa de la condrogénesis, de la osteogénesis ectópica y de las fusiones articulares ⁽¹⁷⁾. Estos cambios no se detectaron en familiares de pacientes ni en los controles analizados, demostrando así la penetrancia completa de la enfermedad.

El análisis de expresión del mRNA de ACRV1, por medio de RT-PCR y de secuenciación, mostró que tanto el mRNA silvestre como el mutante, se

expresan en células con FOP, sugiriendo que los efectos de la mutación no se deben a haploinsuficiencia, sino a una ganancia de función (12).

La mutación genera un cambio en el aminoácido 206 produciendo así una sustitución de arginina por histidina (R206H). Este aminoácido se encuentra altamente conservado entre vertebrados y corresponde a la parte final del dominio GS el cual se une al dominio proteína cinasa del mismo gen (13). En el tipo silvestre la arginina forma un enlace iónico con el aspartato del codón 269 el cual tiene especificidad a SMAD. El cambio por histidina provoca un enlace iónico sensible a pH, provocando una activación ligando independiente (12,20).

La presencia de la mutación genera un cambio conformacional en la estructura normal del receptor lo cual se ha relacionado de manera directa con las malformaciones observadas. Sin embargo la osificación heterotópica presente en la enfermedad se ha atribuido a cambios en el microambiente celular en el que se presentan cambios inflamatorios y de perfusión tisular que generan un microambiente hipóxico con la consecuente activación constitutiva del receptor(23).

La *figura 9* esquematiza los cambios en el receptor.

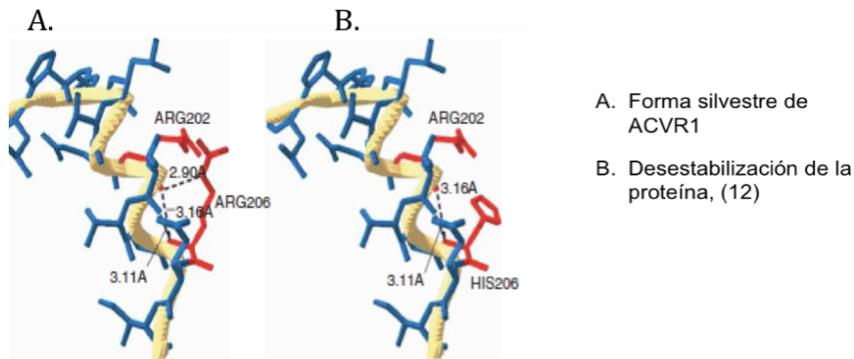


Figura 9 (12)

Tal y como se mencionó anteriormente, el dominio GS es un sitio de unión para FKBP1A el cual al verse alterado provoca la activación constitutiva del receptor, aumentando así la expresión de BMP's y la expresión de sus "blancos" transcripcionales, además de acumular receptores tipo I en la membrana celular (12, 13).

La *figura 10* esquematiza la señal de las proteínas morfogenéticas de hueso en pacientes con FOP. En la figura (A), se representa como la ausencia de ligando mantiene al complejo SMAD/SMURF-FKBP1A (FKPB12) unido a ACVR1, lo cual previene la actividad promiscua del receptor; el complejo promueve la degradación del receptor por medio de ubiquitinación, manteniendo así una concentración de receptores adecuada en la membrana celular. En la figura (B), el complejo ya no se mantiene unido a ACVR1 debido a que existe un ligando que promueve que se active la cascada de señalización de BMP. En la figura (C), se observa como las células de pacientes con FOP impiden la unión del complejo SMAD/SMURF, provocando la acumulación de receptores en la

membrana celular con una activación constitutiva de los receptores, mismos que en presencia de ligando, figura (D), producen una respuesta de sobre-expresión de los genes “blanco” de BMP (15).

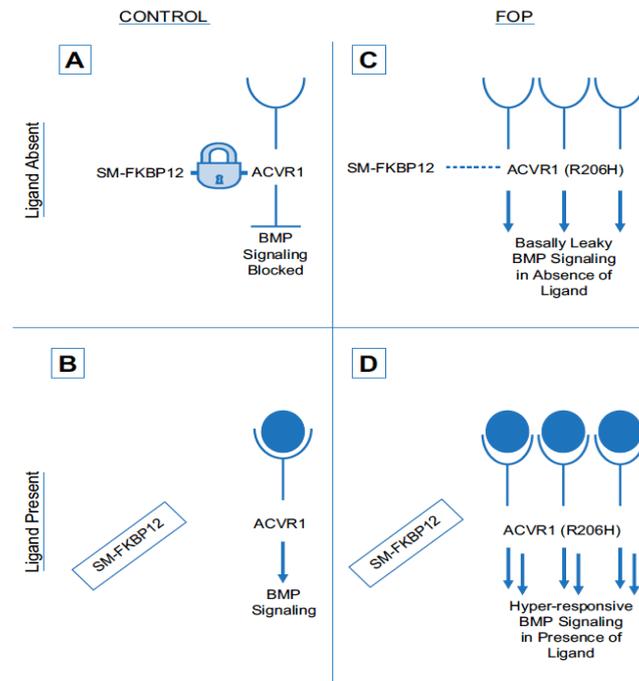


Figura 10 (15)

Gracias a los estudios en células-madre altamente proliferativas, aisladas de la pulpa de los dientes primarios de pacientes con FOP , se ha documentado que la señalización de BMP defectuosa provoca, entre otras, una expresión aumentada del mRNA de Runx2, un regulador de la formación del hueso así como una expresión aumentada de fosfatasa alcalina (ALP).

De esta manera, se concluyó que la señal de BMP es necesaria, mas no suficiente, para la diferenciación osteogénica de estas células (17).

CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Pequeñas variaciones en el genotipo pueden dar lugar a grandes variaciones en el fenotipo. Se han encontrado pacientes con características clásicas y modificaciones de las mismas, y otras características clínicas poco comunes, gracias a lo cual se ha podido establecer la correlación genotipo-fenotipo. Se sabe que la mayoría de los pacientes porta la mutación 617 G>A (en forma heterocigota) la cual confiere el tipo clásico de la enfermedad. También se sabe que características adicionales en estos pacientes pueden ser coincidentes, o deberse a genes modificadores (21).

En la *figura 11* se muestran otras mutaciones reportadas: c.619 C>G (Q207E), c.982 G>A (G328R), G356D, c.982 G>C (G328R), c.982 G>T (G328W), c.983 G>A (G328E), c.1067 G>A (G356D) c.1124 G>C (R375P), c.774 G>C (R258S). Esto demuestra que todos los pacientes con FOP pueden presentar mutaciones de sentido equivocado, o bien, tener deleciones en las regiones codificantes (21,22).

Al parecer, las mutaciones G328W y G328E, se asocian a un fenotipo más severo; mientras que el cambio G328R se asocia a un fenotipo leve con ausencia de malformaciones en los primeros orfejos (21). Cada una de las variantes activan a ACVR1 para amplificar la señal del receptor (21, 23).

La *figura 11* representa los dominios de la proteína y las mutaciones reportadas hasta ahora:

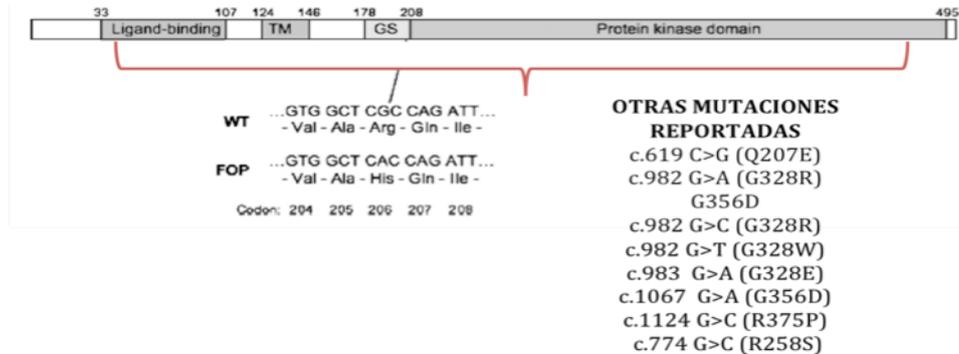


Figura 11 (20)

TRATAMIENTO

En la FOP la prevención de traumatismos se considera un aspecto esencial y de cuidado mayor. Hace algunos años se emplearon los bifosfonatos sin éxito alguno. Posteriormente, al observarse la influencia de los mediadores de la inflamación, se comenzó el uso de medicamentos antiinflamatorios tratando de evitar el desarrollo del brote inflamatorio y de la posterior osificación. La osteotomía es un procedimiento que resulta contraproducente y deberá contraindicarse salvo en condiciones muy particulares.

Actualmente todas las intervenciones médicas son de soporte. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), incluyendo los inhibidores de COX 1 y COX2; inhibidores de leucotrienos y estabilizadores de mastocitos, se utilizan para manejar el dolor crónico así como los nuevos

brotos. Los glucocorticoides (prednisona) se utilizan en dosis que varían entre 0.5 a 1 mg/kg/d ⁽¹¹⁾.

Actualmente no existen tratamientos que modifiquen la historia natural de la enfermedad ⁽¹⁵⁾. Debe señalarse que la anestesia general es peligrosa, debido a la posible restricción ventilatoria (secundaria a osificaciones en la caja torácica), como a la fusión de las vértebras cervicales, lo cual dificulta las maniobras de intubación; la rehabilitación física ayuda a preservar la movilidad de las articulaciones parcialmente.

En 1988, se fundó la Asociación Internacional de Fibrodisplasia Osificante Progresiva (IFOPA), <http://www.ifopa.org>, con sede en E.U.A. ⁽⁴²⁾. Su misión es proveer de medios para la educación en FOP, al personal de la salud, a los pacientes y sus familiares ⁽¹⁵⁾.

Gracias a los avances moleculares, la meta terapéutica actual es el desarrollo de terapias farmacológicas eficientes que mejoren o reviertan la enfermedad. Estudios recientes reportan respuesta a inhibidores del receptor entre los que se encuentra la Dorsomorfina. Esta línea de investigación sigue en desarrollo.

Los objetivos moleculares actuales se orientan hacia el bloqueo de la actividad constitutiva del receptor, el bloqueo de los brotes inflamatorios o bien, la alteración del microambiente que promueve la osificación heterotópica ⁽²³⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La historia natural de la Fibrodisplasia Osificante Progresiva es catastrófica y el retraso en el diagnóstico o un diagnóstico erróneo conducen a procedimientos diagnósticos innecesarios que en muchos casos desatan el curso de la enfermedad, empeoran la calidad de vida y aceleran la muerte de los pacientes. A pesar de la baja prevalencia de la enfermedad es necesaria la capacitación tanto del médico general como del médico especialista en áreas afines a esta enfermedad con la finalidad de la detección temprana de la misma para evitar así complicaciones que limiten su calidad de vida y limiten la expectativa de vida del paciente.

En México no existen reportes de análisis moleculares en pacientes con Fibrodisplasia Osificante Progresiva que comprueben que la mutación reportada mundialmente en el 90% de los casos tenga la misma incidencia.

Debido a esto, el diagnóstico molecular para identificar la mutación 617 G>A que se presenta en el 90% de los casos, se convierte en una valiosa herramienta diagnóstica.

Debemos señalar que la sospecha clínica en neonatos con malformaciones de los primeros orfejos, deberá ser una condicionante para realizar el diagnóstico molecular temprano, ya que permitirá el establecimiento de medidas preventivas que redundarán en una mejor calidad de vida de los pacientes y en la posibilidad de un asesoramiento genético adecuado de los padres.

OBJETIVO

Identificar la presencia de la mutación 617G>A en el exón 4 del gen ACVR1 en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico y radiológico de Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP) y en algunos casos de sus progenitores, mediante la técnica de secuenciación de DNA.

MATERIAL Y MÉTODO

Diseño del estudio:

Estudio transversal, descriptivo y observacional

Población

7 pacientes mexicanos con el diagnóstico clínico y/o radiológico de FOP

Criterios de inclusión:

1. Pacientes de ambos sexos y cualquier edad con diagnóstico clínico y radiológico de Fibrodisplasia Osificante Progresiva que deseen participar en el estudio.

Criterios de eliminación

1. Muestra de DNA insuficiente o de mala calidad para el análisis de secuenciación

Universo de Trabajo

Los participantes fueron seleccionados en la consulta del Servicio de Genética de los Servicios participantes; Instituto Nacional de Rehabilitación de la Ciudad de México (2 pacientes), Servicio de Genética del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” (3 pacientes) y del Servicio de Genética del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la ciudad de Monterrey (2 pacientes).

Procedimiento

Bajo consentimiento informado (anexo2) se obtuvieron 5 cm³ de sangre periférica mediante venopunción de cada uno de los participantes. En los casos de pacientes de otras instituciones, las muestras fueron enviadas al Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

En los pacientes del INR fue posible realizar historia clínica (anexo 1), examen físico y estudios de imagen. Se solicitó resumen clínico de aquellos pacientes que se encontraban en otra parte de la República Mexicana.

La muestra de sangre periférica de los pacientes del INR fue colectada en tubo con EDTA y procesada mediante el Kit “*Puregene*” de Qiagen para extracción de DNA. Las muestras de otros centros de referencia fueron procesadas en sus

laboratorios y enviadas mediante servicio de paquetería al Instituto Nacional de Rehabilitación.¹

El DNA obtenido fue cuantificado por espectrofotometría (A_{260}) y se realizaron diluciones a 100 ng/ μ l para los experimentos de PCR.

Los primers utilizados fueron solicitados de acuerdo al artículo de Shore 2006⁽¹²⁾:

FOP-F: 5'- CCAGTCCTTCTTCCTTCTTCC-3'

FOP-R: 5- AGCAGATTTTCCAAGTTCCATC-3'

Las reacciones de PCR se realizaron en 20 μ l totales en las siguientes condiciones:

- Buffer 10X para PCR: 2 μ l
- Nucleótidos (200 μ M) : 2 μ l
- MgCl₂ (25mM) : 1.2 μ l
- FOP-F (10 μ M): 2 μ l
- FOP-R (10 μ M): 2 μ l
- H₂O: 7.9 μ l
- Taq 5 U/ μ l (Fermentas): 0.88 μ l
- DNA (100ng/ μ l): 2 μ l

¹ Nota: los consentimientos informados de los pacientes foráneos se encuentran en el servicio de genética del hospital al que pertenecen.

Se realizó la PCR en un termociclador *Corbett Research* con los siguientes ciclos: 1 ciclo a 95°C durante 1 minuto; 40 ciclos con 1 min a 95°C, 25 segundos a 67°C, 1 min a 72°C; finalmente 1 ciclo de 10 minutos min a 72°C. Las muestras se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y las bandas obtenidas se cortaron y purificaron con el Kit de Qiaex para extracción de DNA a partir de gel. Con 20 ng del fragmento de PCR purificado, se realizaron las PCR de secuencia con el kit Big Dye Terminator versión 3.1 (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones y con el programa de amplificación recomendado por el proveedor:

- Big dye: 1 µl
- Buffer 5X: 1. 5 µl
- Primer (0.8 pMol): 0.8 µl
- H₂O: 4.7 µl
- DNA: 2 µl

Se realizó limpieza de las reacciones de secuencia por precipitación con isopropanol y se corrieron en un secuenciador de DNA ABI PRISM modelo 310 de Applied Biosystems. Se analizaron los electroferogramas obtenidos y se compararon las secuencias con la del gen ACVR1 reportada en GenBank (NG_008004.1)⁽³⁹⁾.

En la *figura 12* se muestran los primers específicos para el exón 4 y la base en donde ocurre el cambio G>A:

```
aaccagtccttcttcttccagaggagctttacatgtacactaacaggccacgtgtcccggattgctgcccttcatgtgag  
ttacaatgtcatgcatgctaataactcceaagtgaggagctatattgctcaatcgttctttccccttgcttaaacacaggattt  
attgatcattcgtgtacatcaggaagtggtctggtcttctttctggtacaaagaacagtggtcgcagattacactgtt  
ggagtgtcggtaattctttttcctttcttgggtaatatgcaatgtagttttggaagtaaaagatggaacttgaaa  
atctgct
```

Figura 12 (39)

Se buscó la mutación G >A en la posición 617 del cDNA reportada por Shore y colaboradores (12). La nomenclatura de las mutaciones encontradas se basa en la utilizada en ese artículo en donde las identifican de acuerdo al número de nucleótido que refleja la secuencia de cDNA tomando como nucleótido 1 la adenina del triplete ATG del primer exón.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 7 muestras obtenidas del mismo número de pacientes y dos muestras más provenientes de las madres de dos de los pacientes. Los 7 pacientes mostraron el fenotipo de Fibrodisplasia Osificante Progresiva, las dos madres analizadas molecularmente son fenotípicamente sanas. Una de las muestras de los 7 pacientes no tuvo la calidad necesaria para realizar la prueba molecular, por lo que realmente se analizaron 6 muestras.

Resultados clínicos:

Se obtuvo la información clínica de 4 de los pacientes (dos evaluados en el INR de manera directa, dos resúmenes enviados del Hospital de Monterrey y de los provenientes de la Ciudad de Guadalajara sólo se enviaron las muestras sin resumen clínico, sin embargo, la evaluación genética en su lugar de origen los clasifica como FOP).

Todos los pacientes son casos esporádicos con excepción de los pacientes 3 y 4 que se corresponden a un caso familiar.

A continuación se detallan los datos clínicos que se pudieron obtener de los pacientes:

Paciente 1:

Femenino de 14 años de edad, sin antecedentes pre y perinatales de importancia. Presenta al nacimiento acortamiento de primer orjejo (*figura 13*) bilateral a expensas de acortamiento de primer metatarsiano bilateral, a los 7 años inicia con brote inflamatorio doloroso en rodilla izquierda posterior a caída con osificación en la zona, sometida a cirugía para resección ósea, sin mejoría. Osificación de articulación temporo-mandibular (*figura 17*) a los 10 años posterior a amigdalectomía y aparición de brotes inflamatorios (*figura 14*) con osificación desde los 9 años de edad en tórax posterior y tobillo derecho que limitan su actividad.

Los estudios radiológicos revelan fusión cervical, zonas de osificación heterotópica con prolongaciones digitiformes y ramificadas abarcando todo el hemitórax óseo (*figura 15*) así como en zona subescapular; también se observan cuellos femorales cortos (*figura 16*) y ensanchados así como osteocondromas de tibia proximal (*figura 18*).



Figura 13

Figura 14

Figura 15

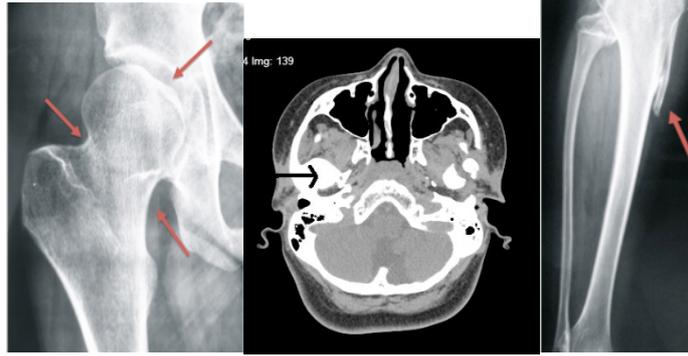


Figura 16

Figura 17

Figura 18

Paciente 2:

Paciente masculino de 15 años de edad. Madre con amenaza de aborto en primer trimestre sin otras complicaciones. Presenta al nacimiento malformaciones de primeros orfejos a expensas de monofalange bilateral (figuras 19 y 20) y criptorquidia bilateral. Inicia con brotes inflamatorios y posterior osificación a los 13 años en tórax posterior. Los estudios radiológicos muestran fusión cervical (figura 21), osificación heterotópica en espacio escapulocostal, borde de la parrilla costal bilateral (figuras 22 y 23) y de escápula a diáfisis humeral.



Figura 19

Figura 20

Figura 21



Figura 22



Figura 23

Paciente 3 y 4:

Se trata de un caso familiar cuya genealogía se muestra en la figura 24:

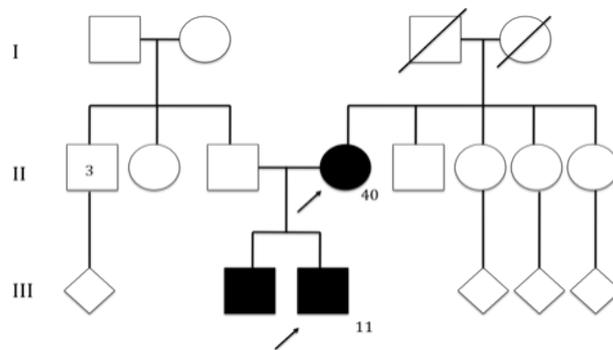


Figura 24: Cortesía del Dr. Daniel Campos del servicio de genética del hospital Universitario de Monterrey

El paciente 3 es un paciente femenino de 40 años de edad, presenta malformaciones congénitas de primeros ortejos a expensas de acortamiento de primer metatarsiano bilateral, sin otros antecedentes de importancia. Inicia su padecimiento actual a los 20 años notando dificultad para el movimiento de tórax con apariciones de prominencias

óseas en cuello, tórax posterior, columna y extremidades inferiores. Los estudios radiológicos muestran osificación heterotópica en borde costal bilateral, unión escápulo-humeral (figuras 25 y 26) y columna torácica.



Figura 25 y 26 cortesía del Dr. Daniel Campos del servicio de genética del hospital Universitario de Monterrey

El paciente 4 es un masculino de 11 años de edad que presenta malformaciones congénitas de primeros orfejos a expensas de acortamiento de primer metatarsiano bilateral. Presenta desde los 6 años de edad brotes inflamatorios con osificación en cuello y tórax y a la exploración presenta asimetría facial, contractura del esterno-cleido-mastoidedo derecho, escoliosis y limitación al movimiento de extremidades superiores.

Nota: No fue posible obtener los datos clínicos de los pacientes 5, 6 y 7 (muestras enviadas del Servicio de Genética del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”).

La *tabla 2* resume los datos clínicos de los pacientes

Paciente	Edad en años	Sexo	Malformación de ortijos	Osificación heterotópica Progresiva	Otras malformaciones	Institución de procedencia de los Pacientes
1	14	F	✓	✓	Fusión vértebras cervicales, cuello femoral corto y ancho, amenorrea primaria, osificación de ATM	INR
2	15	M	✓	✓	Fusión vértebras cervicales, criptorquidia	INR
3	40	F	✓	✓	Fusión vértebras cervicales	Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la ciudad de Monterrey. NL.
4	11	M	✓	✓	Asimetría facial	Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la ciudad de Monterrey, NL.
5	ND	M	ND	ND	ND	Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"
6	ND	F	ND	ND	ND	Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"

*ND: datos no disponibles

Tabla 2

Resultados del análisis molecular

La *tabla 3* muestra los resultados del estudio molecular:

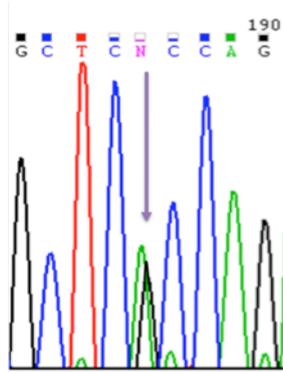
Paciente 1	Mutación heterocigota 617 G→A
Paciente 2	Mutación heterocigota 617 G→A
Paciente 3	Mutación heterocigota 617 G→A
Paciente 4	Mutación heterocigota 617 G→A
Paciente 5	Mutación heterocigota 617 G→A
Paciente 6	No se encontró la mutación G→A
Paciente 7	Muestra de mala calidad. No fue posible realizar la secuenciación

Tabla 3

Tal y como se mencionó anteriormente, se secuenciaron las muestras de las madres sanas de dos pacientes (del paciente 6 y del paciente 7) y de controles sanos en donde no se encontró el cambio, la secuencia estaba acorde con la GenBank²₍₄₀₎.

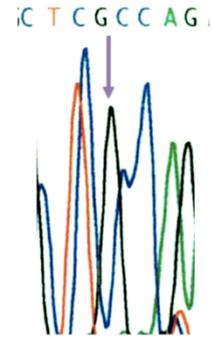
² Nota: la nomenclatura de la mutación utilizada será la misma que en la bibliografía consultada

En las *figuras 27 y 28* se muestran los electroferogramas con la presencia y la ausencia de la mutación:



Paciente con mutación G>A

Figura 27



Control sano

Figura 28

La *tabla 4* resume los datos clínicos y moleculares encontrados durante este estudio:

Tabla 4

Paciente	Edad en años	Sexo	Malformación de orjejos	Osificación heterotópica Progresiva	Otras malformaciones	Mutación encontrada
1	14	F	✓	✓	Fusión vértebras cervicales, cuello femoral corto y ancho, amenorrea primaria, osificación de ATM	Mutación heterocigota G617A
2	15	M	✓	✓	Fusión vértebras cervicales, criptorquidia	Mutación heterocigota G617A
3	40	F	✓	✓	Fusión vértebras cervicales	Mutación heterocigota G617A
4	11	M	✓	✓	Asimetría facial	Mutación heterocigota G617A
5	ND	M	ND	ND	ND	Mutación heterocigota G617A
6	ND	F	ND	ND	ND	No se encontró mutación G617A

*ND: datos no disponibles

DISCUSIÓN

La Fibrodisplasia Osificante Progresiva es una rara pero catastrófica enfermedad genética con herencia autosómica dominante cuya historia natural puede agravarse debido a un diagnóstico erróneo o al desconocimiento de la enfermedad. Es importante que médicos generales y especialistas tengan en cuenta los datos clínicos típicos de la enfermedad, ya que la simple sospecha es capaz de prevenir intervenciones innecesarias que generen complicaciones irreversibles.

La clave del diagnóstico en la mayoría de los casos son la presencia de malformaciones congénitas de los primeros orfejos ya que representan el preámbulo hacia las primeras manifestaciones que desencadenan la osificación heterotópica. Sin embargo, la ausencia de estas no excluye la presencia de la enfermedad.

Actualmente, las medidas preventivas de la osificación heterotópica han probado ser las de mayor utilidad para evitar sus complicaciones. Sin embargo, la historia natural de la enfermedad conlleva a una muerte prematura y a una disminución de la calidad de vida que comprende aspectos físicos y psicológicos. Los tratamientos farmacológicos entre los que se incluyen los corticoides y los antiinflamatorios no han probado su eficacia, únicamente se limitan a mejorar las molestias de los pacientes ⁽¹⁸⁾. La terapia de rehabilitación mejora la limitación de movimiento aunque no es de gran utilidad.

En esta muestra de pacientes, todos presentaron las malformaciones congénitas variables de primeros orjejos, entre las que encontramos monofalanges o acortamientos de los primeros huesos metacarpianos, todas ellas han sido reportadas previamente en la literatura.

Debemos señalar que no fue posible obtener los datos clínicos de todos los pacientes ya que algunos provienen de instituciones de otros sitios de la República Mexicana, no obstante, todos fueron evaluados por genetistas clínicos quienes integraron el diagnóstico clínico y radiológico correspondiente.

Los hallazgos clínicos y radiológicos en este grupo de pacientes son semejantes con los hallazgos reportados en la literatura, con excepción de la criptorquidia bilateral que se encontró en un paciente pudiendo ser una característica coincidental.

En dos pacientes (1 y 2), el diagnóstico tardío llevó a toma de biopsia innecesaria con la consecuente osificación en el sitio de la toma y la limitación del movimiento de esa zona. En uno de estos pacientes, la amigdalectomía resultó en osificación de la articulación temporomandibular temprana que actualmente compromete su calidad de vida. Estas complicaciones ponen de manifiesto la importancia de tener en cuenta las complicaciones y las causas de muerte más frecuentes, con la finalidad de apoyar con todos los recursos que se tengan disponibles en esas áreas y llevar un seguimiento estrecho de los pacientes para prevenir o detectar cualquier complicación con prontitud.

Hallazgos moleculares:

El gen ACVR1 codifica para un receptor de activina A tipo I cuya función radica en la fosforilación de las proteínas SMAD a través de la fosforilación de su dominio GS. La mutación provoca un cambio conformacional en este dominio capaz de inducir su actividad constitutiva en ausencia de ligando y desregular la vía de señalización con la consecuente osificación heterotópica (23).

Mutaciones en el gen ACVR1 son las responsables de la enfermedad, siendo la más frecuente el cambio de una guanina por una adenina en la posición 617 del cDNA (617 G>A) y dando por resultado un cuadro clínico típico.

La identificación reciente del defecto molecular, ha abierto muchas posibilidades tanto en el campo de la investigación básica como clínica, ya que ha permitido ahondar en el conocimiento de la relación genotipo-fenotipo y en la función de los receptores tipo I y su papel dentro de la cascada de señalización de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) que se encargan de gran parte del desarrollo embrionario como la formación de hueso en tiempo y espacio definidos.

Esta mutación es responsable de las malformaciones congénitas típicas asociadas a la enfermedad, sin embargo, se requiere de un microambiente ácido e hipóxico para desencadenar la osificación heterotópica (23). Esto permite deducir que los pacientes que presenten las malformaciones congénitas típicas serán portadores de la mutación antes mencionada y que fenotipos atípicos o con grandes variaciones clínicas probablemente porten otra mutación dentro de la región codificante del gen que altere la función del receptor.

La literatura reporta que la mayoría de los pacientes con el fenotipo clásico presentan la mutación 617 G>A. En este trabajo, se buscó dicha mutación en un grupo de pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de FOP. En la muestra de pacientes analizada la prevalencia de esta mutación fue de 83%, esto es similar al reportado en la literatura internacional para otras poblaciones. En todos estos casos fue posible hacer una correlación genotipo-fenotipo.

En uno de los pacientes no se encontró la mutación en el exón analizado, sin embargo, fue enviado con el diagnóstico clínico y radiológico de FOP (de acuerdo a la referencia del servicio de origen), en este caso es posible que sea portador de alguna otra mutación en el mismo gen, lo cual no se determinó en este estudio. Las características clínicas no pudieron obtenerse de manera personal por lo que resulta conveniente realizar secuenciación completa del gen y la correlación clínica.

Con base en nuestros resultados y en los reportes encontrados, se infiere que aún cuando se analice una muestra con mayor número de pacientes la prevalencia de la mutación encontrada en este estudio será similar. Habrá que realizar un estudio in extenso para corroborarlo y buscar otras mutaciones en el resto del gen en los pacientes negativos para la mutación 617 G>A, lo cual permitirá realizar una correlación genotipo-fenotipo en población mexicana de una manera más completa.

Insistimos en que el diagnóstico molecular de los pacientes en forma temprana permitirá evitar complicaciones y procedimientos innecesarios que compliquen el curso natural de la enfermedad. El adecuado asesoramiento genético es indispensable para que el paciente sea capaz de entender la naturaleza de su

enfermedad, conozca los retos a los cuales deberá enfrentarse y sea además orientado con respecto al manejo de la enfermedad así como a la prevención de posibles complicaciones.

Se espera que el uso de esta metodología pueda generalizarse en las instituciones de salud de nuestro país para establecer un centro de referencia nacional con fines diagnósticos y de investigación.

La importancia de la identificación de las mutaciones que correlacionan el genotipo con el fenotipo y el correcto entendimiento del comportamiento de la mutación hacen que hoy en día sea posible pensar en una terapia génica exitosa, se encuentran bajo investigación moléculas inhibitoras como la dorsomorfina que parece tener actividad selectiva contra el receptor lo que abre una ventana de esperanza en un futuro para estos pacientes.

CONCLUSIONES

1.- Se analizaron 7 pacientes con diagnóstico clínico y radiológico compatible con FOP.

2.- La mutación 617 G>A se presentó en el 86% de los casos (5 pacientes). Esto es similar a lo reportado en la literatura mundial.

3.- Todos los pacientes portadores de la mutación (a excepción de aquellos en los que no fue posible encontrar los datos) presentan las características clínicas típicas de la enfermedad de FOP clásica pudiéndose encontrar una correlación genotipo-fenotipo.

4.- Se presume que en el paciente no portador de la mutación pero con el diagnóstico de FOP habrá que realizar secuenciación completa del gen en búsqueda de otra mutación.

5.- Es necesaria la capacitación del médico general y especialista sobre la enfermedad con la finalidad de evitar complicaciones posteriores.

6.- La estandarización de la técnica permite al INR ser centro de referencia para realizar el diagnóstico temprano de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. J.Connor, D.A.P.Evans, "Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. The clinical features and natural history of 34 patients", *The Journal of Bone and Joint Surgery*, Vol 64-B, No 1, 1982.
2. Randolph, Cohen, Hahn, et. Al. "The Natural History of Heteropic Ossification in Patients Who Have Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. A study of forty-four patients", *The Journal of Bone and Joint Surgery*. Vol 75^a, No 2, February 1993.
3. Kaplan, et al. "Genetic Transmission of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. Report of a family". *The Journal of bone and Joint surgery*. Vol 75-A, No 8 August 1993.
4. Feldman, Ming, Shelden, Shore "Fibrodysplasia Ossificans Progressiva, a Heritable Disorder of Severe Heterotopic Ossification, Maps to Human Chromosome 4q21-31". *Am. J. Hum. Genet.* 66:128-135; 2000
5. Gannon, Glaser, Shore, Kaplan. "Mast Cell Involvement in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva". *Human Pathology*, Volume 32, No.8, August 2001
6. Sferco, Naser, Robledo, Fili, Tramunt "Fibrodysplasia osificante progresiva: pautas para su reconocimiento". *Arch argent pediatr* Vol 99 No 3, 2001
7. Urtizbera JA 2003. "Fibrodysplasia Ossificans progressiva (FOP)". *Orphanet Encyclopedia*. November 2003
8. Kaplan, Shore, Glasser, Emerson, et al. "The Medical Management of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: current treatment considerations" *Clin Proc Intl Clin Consort FOP* 1 (2):1-81, 2003
9. Herford, Philip, Calif. "Ankylosis of the jaw in a patiente with fibrodysplasia ossificans progressiva" *Oral surgery Oral medicine Oral pathology* vol 96, no 6, 680-684, December 2003
10. Kitterman, Kantaine, Rocke, Kaplan. "Iatrogenic Harm Caused by Diagnostic Errors in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva". *PEDIATRICS* Vol 116 No.5 November 2005

11. Lasry, Touki, Abkani, Khalifa. "A rare cause of painful cervical swelling: myositis ossificans progressiva in childhood Report of a case". *Joint Bone Spine*; 72, 335-337,2005
12. Shore, Xu, Kaplan, et al. "A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited an sporadic Fibrodysplasia ossificans progressiva". *Nature genetics* volumen 38, No 5, may 2006
13. Kaplan, Glaser, Pignolo, Shore. "A new era for Fibrodysplasia ossificans progressiva: a druggable target for the second skeleton", *Expert Opin Biol Ther* (2007) 7 (5)
14. Hamilton, Piers, Renshaw. "Fibrodysplasia Ossificans progressiva: a new spotlight on an old disease-a case report". *Acta Orthopaedica*; 79 (3): 449-451, 2008
15. Kaplan et al. "Fibrodysplasia Ossificans Progressiva". *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. Vol 22 No1 p.p. 191-205, 2008.
16. Kaplan, Xu, Shore, et al. "Early Diagnosis in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva" *PEDIATRICS*, Volume 121 No 5, May 2008
17. Billings, Fiori, Shore, Kaplan, et al. "Dysregulated BMP Signaling and Enhanced Osteogenic Differentiation of Connective Tissue Progenitor Cells From Patients With Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP)". *Journal of Bone and Mineral Research* Volume 23, No 3, 2008.
18. Kaplan, Shore, Glasser, Emerson, et al. "The Medical Management of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: current treatment considerations". *Clin Proc Intl Clin Consort FOP* 3 (2):1-85, 2008
19. Furuya, Ikezoe, Wang, Fukumaki, et. al. "Clinical Report A Unique Case of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva With an ACVR1 Mutation, G356D, Other Than the Common Mutation (R206H)". *American Journal of Medical Genetics Part A* 146^a: 459-463, 2008.
20. Shore, Kaplan, et al. "Insights from a rare genetic disorder of extra-skeletal bone formation, Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP)". *Bone* 43 , 427-433, 2008

21. Kaplan, Xu, Shore et. al. "Classic and Atypical Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) Phenotypes Are Caused by Mutations in the Bone Morphogenetic Protein (BMP) Type I Receptor ACVR1". *Human Mutation*, Vol. 30, No. 3, 379-390, 2009
22. Bocciardi, Bordo, Duca, Rocco, Ravazzolo. "Mutational analysis of the ACVR1 gene in Italian patients affected with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: confirmations and advancements". *European Journal of Human Genetics*, 17, 311-318, 2009
23. Kaplan, Pignolo, Shore. "The FOP metamorphogene encodes a novel type I receptor that dysregulates BMP signaling". *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20, 399-407, 2009
24. Toru Fukuda."Constitutively activated ALK2 and increased SMAD 1/5 cooperatively induce BMP signaling in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva". *The Journal of biological chemistry*. March; 284(11): 7149-56, 2009
25. Editorial. "Bone morphogenetic proteins (BMPs): From morphogens to metabologens". *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20, 341-342; 2009
26. Eivers, Demagny, Robertis. "Integration of BMP and WNT signaling via vertebrate Smad 1/5/8 and Drosophila Smad". *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20, 357-365; 2009
27. Nickel, Sebald, Groppe, Mueller. "Intricacies of BMP receptor assembly". *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20, 367-377; 2009
28. Song, Estrada, Lyons. "Smad signaling in skeletal development and regeneration". *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20, 379-388; 2009
29. Hong, Yu. "Applications of small molecule BMP inhibitors in physiology and disease". *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20, 409-418; 2009
30. Suda, Billings, Egan, Glaser, Porter, Shore, Pignolo, et.al. "Circulating Osteogenic Precursor Cells in Heterotopic Bone Formation" *STEM CELLS*;27:2209-2219, 2009
31. Louvney, Ramachandran, shore, Glaser, Kaplan, et al. "Identification of Progenitor Cells That Contribute to Heterotopic Skeletogenesis". *The Journal of Bone and Joint Surgery Am*, 91:652-63; 2009

32. Kaplan, Zasloff, Kitterman, Shore, Rocke. "Early Mortality and Cardiorespiratory Failure in Patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva." *The Journal of Bone & Joint Surgery Am* ;92:686-691, 2010
33. Jones. "**Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation**" 2006, 6th edition, E.U.A.568-571
34. Moore, Persaud. "**Embriología Básica**", 5ª edición, Mc Graw-Hill Interamericana, México 2000, 414-417
35. Castriota-Scanderbeg, Dallapiccola. "**Abnormal Skeletal Phenotypes from single signs to complex diagnosis**" Springer. Germany 2005 pp 439
36. Gorlin, Cohen, Hennekam, "**Syndromes of the Head and Neck**" 4th edition. Oxford University Press, Mc Graw Hill, 2001, E.U.A. pp: 312-315
37. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) MIM ID# 135100 FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA; FOP. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/135100>
38. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) MIM ID *102576 ACTIVIN A RECEPTOR, TYPE I; ACVR1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/102576>
39. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BMPR1A&search=BMP+receptor>
40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_008004.1?&from=4249&to=143665&report=genbank
41. Lewin, "**Genes VIII**", 2004, E.U.A. pp: 838-839
42. <http://www.ifopa.org>

ANEXO1

1



SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN
SERVICIO DE GENÉTICA



ARBOL GENEALÓGICO

Nombre: _____ No. exp : _____ No caso: _____

Consanguinidad: _____ Endogamia: _____

Fecha: _____



Antecedentes personales patológicos

Antecedentes gineco-obstétricos

Menarca	Ritmo	Pubarca	Telarca
Gesta:	Para:	Cesáreas:	Abortos
FUM	FUP	Método de plan fam:	

Antecedentes pre y perinatales

G:	P:	C:	A	Duración del embarazo:
Ingesta de medicamentos:				Exposición a radiación:
Exposición a teratógenos:				USG:
Enf. durante la gestación:				Amenaza de aborto:
				Amenaza de parto prematuro:
Peso al inicio del embarazo				Peso al final

Movimientos fetales

Atención del parto:

Complicaciones

Placenta	L. Amniótico	Cordón
Lloró:	Respiró:	
Producto		
Talla	Peso	Apgar
P. C:	P. T:	P. A:
Cianosis	Convulsiones	Ictericia
Internamiento	Otros:	



SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN
SERVICIO DE GENÉTICA



Crecimiento y desarrollo

Succión:

Dentición

Ablactación

Sostén cefálico

Sedestación

Bipedestación

Marcha asistida e independiente

Monosílabos

Palabras

Frases

Control de esfínteres

Padecimiento actual

Interrogatorio por aparatos y sistemas

Estado general

Reproductor

Piel

Musculoesquelético

Cabeza y cuello

Neurológico

Respiratorio

Psiquiátrico

Cardiovascular

Endocrino

Digestivo

Hematológico

Urinario



Exploración física

Talla:	Peso:	PC:	PT:
PA:	Brazada	SS:	SI:
F. C:	F. R:	T.A:	Temp
Hábito			



Cráneo

Cara

Cuello

Tórax

Abdomen

Extremidades

Genitales

Piel

Estudios especiales

Observaciones

Plan

Diagnóstico probable

Diagnostico final

Etiología

Elaboró

ANEXO 2



INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
SERVICIO DE GENÉTICA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

México D.F. a _____ de _____ de 20__

A quién corresponda:

Por medio de la presente hago de su conocimiento que he dado mi consentimiento en forma libre, voluntaria y sin presiones para participar en el proyecto "**ANÁLISIS MOLECULAR DE FIBRODISPLASIA OSIFICANTE PROGRESIVA**" que realizará la Dra. Leticia Flores Gallegos en el servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación, lo cual he aceptado libre y voluntariamente. He sido informado sobre el procedimiento del estudio que consiste en la extracción de 5 ml de sangre por punción de una vena periférica del brazo, pudiendo existir como complicación la formación de un pequeño moretón o hematoma y que el estudio no tiene ningún costo. La información obtenida será confidencial. Tengo el entendimiento que de este estudio se obtendrá como beneficio el desarrollo de procedimientos diagnósticos más eficaces y un mejor conocimiento para el manejo de mi enfermedad. Por otra parte, estoy en libertad de retirarme del estudio en el momento que lo desee sin que esto modifique la calidad de atención médica que reciba en el Instituto.

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

FIRMA DEL PACIENTE, PADRE O TUTOR: _____

Teléfono: _____

Servicio de Genética.
Dra. Margarita Valdés Flores/ Dra. Leticia Flores Gallegos

Calzada México Xochimilco N° 289 Col. Arenal de Guadalupe
Del. Tlalpan D.F., C.P. 14389 Tel 59991000 ext. 19401-411.