



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
Luis Guillermo Ibarra Ibarra
ESPECIALIDAD EN:
GENÉTICA MÉDICA

Análisis de las redes mRNA-miRNA-circRNA en células mononucleares periféricas derivadas de pacientes con fibrodisplasia osificante progresiva como modelo del proceso de osificación.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN:
GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A:
Iris Araceli Mendoza Hernández

PROFESOR TITULAR
Dra. En C. María de la Luz Arenas Sordo

DIRECTOR DE TESIS

Dr. En C. Alberto Hidalgo Bravo

Ciudad de México

Junio 2024





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Análisis de las redes mRNA-miRNA-circRNA en células mononucleares periféricas derivadas de pacientes con fibrodisplasia osificante progresiva como modelo del proceso de osificación.

DRA. MARÍA DE LA LUZ ARENAS SORDO
PROFESOR TITULAR

DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO
DIRECTOR DE TESIS

DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO
ASESOR DE TESIS

Análisis de las redes mRNA-miRNA-circRNA en células mononucleares periféricas derivadas de pacientes con fibrodisplasia osificante progresiva como modelo del proceso de osificación.

DRA. LYDIA ESTELA ZERÓN GUTIÉRREZ
ENCARGADA DE DESPACHO DE LA DIRECCIÓN
DE EDUCACIÓN EN SALUD

DR. HUMBERTO VARGAS FLORES
SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN MÉDICA

DR. ROGELIO SANDOVAL VEGA GIL
JEFE DEL SERVICIO DE EDUCACIÓN MÉDICA DE POSGRADO

Análisis de las redes mRNA-miRNA-circRNA en células mononucleares periféricas derivadas de pacientes con fibrodisplasia osificante progresiva como modelo del proceso de osificación.

ÍNDICE

- I. Resumen
- II. Introducción
- III. Objetivos
- IV. Hipótesis
- V. Marco teórico
- VI. Justificación
- VII. Planteamiento del problema
- VIII. Material y métodos
- IX. Metodología
- X. Resultados
- XI. Discusión
- XII. Conclusión
- XIII. Bibliografía
- XIV. Anexos

RESUMEN

Introducción:

La Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP) es causada por variantes patogénicas en estado heterocigoto del gen *ACVR1*.

A pesar de tener identificado el gen causante de la enfermedad, los mecanismos moleculares subyacentes a la formación de hueso heterotópico no han sido completamente dilucidados. Se ha propuesto que las células mononucleares en sangre periférica (PBMC) juegan un papel importante secretando factores que inducen la osificación heterotópica. Los miRNAs son reconocidos como reguladores epigenéticos claves de la expresión génica. El papel de los miRNAs en la FOP no ha sido estudiado a profundidad. El análisis del eje de interacción de miRNAs puede contribuir a comprender los procesos celulares que llevan a la formación de hueso heterotópico en estos pacientes. Hasta el momento se han publicado muy pocos estudios enfocados en la regulación epigenética que aportan los miRNAs en esta condición.

Metodología: Se recolectaron muestras de sangre de cinco pacientes con FOP y de cinco individuos sanos. Se aislaron PBMC. Se realizó extracción de RNA total y smallRNAseq utilizando

NextSeq 2000. El análisis de expresión diferencial de miRNAs se realizó utilizando miRge3.0. Se identificaron los genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados y se llevo a cabo análisis de enriquecimiento funcional.

Resultados: Se obtuvieron 11 miRNAs sobreexpresados con significancia estadística y ningún miRNA infraexpresado.

En el análisis de enriquecimiento funcional se identificaron 3849 genes blanco, además de vías de señalización relacionadas con la osificación heterotópica como HIF-1, TNF, MAPK, TGF-beta, VEGFA, VEGFR2.

Conclusiones: Existe expresión diferencial de miRNAs en PBMC derivadas de pacientes con FOP en comparación con controles sanos. Los miRNAs diferencialmente expresados están involucrados en el control de vías celulares claves para la formación de hueso heterotópico. Es necesario validar los miRNAs y genes blanco mediante qPCR a fin de determinar su valor como potenciales herramientas de aplicación clínica.

Palabras clave: Fibrodisplasia osificante progresiva, miRNA, regulación epigenética, osificación heterotópica.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificar los miRNAs, circRNAs y mRNAs con expresión diferencial en células mononucleares periféricas derivadas de pacientes con diagnóstico confirmado de FOP comparado con individuos sin evidencia de la enfermedad pareados por edad y sexo a fin de identificar los ejes de interacción miRNA-circRNA-mRNA involucrados en la formación de hueso heterotópico.

Objetivos específicos

- Aislar células mononucleares periféricas de pacientes con diagnóstico de FOP e individuos pareados por edad y sexo sin evidencia de la enfermedad y realizar extracción de RNA total.
- Analizar mediante secuenciación de RNA pequeño (smallRNAseq) la expresión de miRNAs en ambos grupos de estudio.
- Identificar los transcritos con expresión diferencial entre los grupos de estudio.
- Con los transcritos diferencialmente expresados se realizará análisis de enriquecimiento de funciones biológicas utilizando bases de datos de acceso público.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen miRNAs con expresión diferencial en pacientes con FOP que regulen procesos celulares involucrados en el proceso de osificación heterotópica?

HIPÓTESIS

Los miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con FOP regulan procesos celulares involucrados en el proceso de osificación heterotópica.

MARCO TEÓRICO

La FOP (MIM 135100) es un trastorno caracterizado por la osificación heterotópica de los tejidos blandos, como el músculo esquelético, los ligamentos y los tendones. La mayor parte de la osificación heterotópica comienza en la infancia. El acortamiento del primer dedo de los pies se observa desde el nacimiento en más del 90% de los pacientes con FOP típica. (Katagiri et al., 2021). Otros hallazgos al nacimiento pueden incluir fémur ancho o malformaciones de vértebras cervicales.(Kannu & Levy, 2021). El proceso de osificación en FOP es similar al desarrollo óseo normal. (Katagiri et al., 2021)

Antecedentes históricos

La primera descripción verificable de FOP, fue publicada en la Philosophical Transaction of the Royal Society of London por John Freke en 1740. En 1868, Von Dusch la describió con el nombre de miositis osificante progresiva, dada la presencia de brotes inflamatorios episódicos que afectan al músculo esquelético (De Brasi et al., 2021). Durante la década siguiente, Frankel y Helferich reconocieron el acortamiento del primer dedo de los pies en estos pacientes. Durante casi un siglo, la afección se conoció comúnmente como miositis osificante progresiva (MOP) (Adam et al., 2020a). El término fibrodisplasia osificante progresiva (FOP) fue propuesto por Bauer y Bode en 1940 y adoptado por McKusick en 1960 en reconocimiento de la afectación primaria del tejido conectivo de tendones, ligamentos, fascias y aponeurosis (Kaplan et al., 2020).

La descripción en 2006 de variantes patogénicas en heterocigosis en el gen *ACVR1* como etiología de la FOP, marcó el comienzo de una gran cantidad de conocimiento enfocado a la comprensión de las bases moleculares de la enfermedad (Kaplan et al., 2020). El gen *ACVR1* ha sido mapeado en 2q24.1 por medio de análisis de ligamiento (De Brasi et al., 2021).

Epidemiología

Se estima que la incidencia de FOP es de aproximadamente 1 a 1.7 en 2 millones de recién nacidos vivos en todo el mundo, independientemente de la población o sexo (Katagiri et al., 2021).

Aspectos moleculares

La FOP es causada por variantes patogénicas de ganancia de función en el gen *ACVR1*, que codifica un receptor de la proteína morfogenética ósea (BMP) tipo I. El mecanismo de herencia es autosómico dominante.

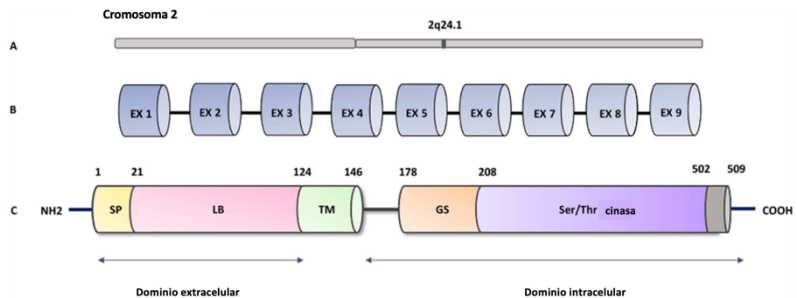


Figura 1. Gen *ACVR1*.

A. El gen *ACVR1* se localiza en el cromosoma 2 en citobanda 2q24.1. **B.** El gen *ACVR1* contiene nueve exones. **C.** Representación esquemática de los dominios de la proteína. El dominio extracelular contiene un péptido señal (SP) y un dominio de unión al ligando (LB), seguido de TM, GS, y dominio serina/treonina cinasa. Modificado de (Nagar et al., 2023).

La variante patogénica en c.617G>A condiciona una sustitución de arginina por histidina en la posición 206 (p.R206H) de la proteína ALK2/ACVR1, que se encuentra en el dominio GS cerca de la región de yuxtamembrana e induce una señalización aumentada a través del transductor canónico de unión al ligando de BMP y activación del receptor, induce la fosforilación de Smad1 y Smad5, así como la señalización de BMP en ausencia de un ligando exógeno (Ravazzolo & Bocciardi, 2021). Esta variante se ha identificado en más del 95 % de los pacientes con FOP. (Katagiri et al., 2021). Otras variantes patogénicas identificadas (12 mutaciones adicionales, p.L196P, p.delP197_F198insL, p.R202I, p.Q207E, p.R258G, p.R258S, p.G325A, p.G328E, p.G328R, p.G328W, p. G356D, y p.R375P) se ubican en los exones 4 a 7 del gen *ACVR1* (Akyuz et al., 2019). Se asocian con una amplia gama de fenotipos esqueléticos en comparación con los pacientes que presentan *ACVR1* R206H. (Towler & Shore, 2022). Todas las variantes patogénicas asociadas con FOP se encuentran en los dominios intracelulares, GS o cinasa.

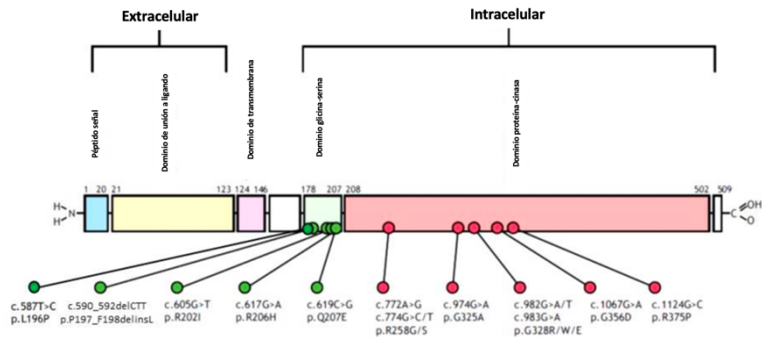


Figura 2. Representación esquemática de los dominios y localizaciones de las variantes patogénicas en el gen *ACVR1*. Modificado de (Valer et al., 2019).

ALK2/ACVR1

En los seres humanos, doce proteínas cinasas transmembrana, incluida ALK2/ACVR1, funcionan como receptores de unión para ligandos de la familia TGF- β y juegan un rol crítico en los procesos de crecimiento y desarrollo (Kaliya-Perumal et al., 2020).

Se clasifican en dos subgrupos, receptores tipo I y tipo II, según la presencia (tipo I) o ausencia (tipo II) de un dominio característico de residuos de glicina y serina (dominio GS) en el dominio yuxta-membrana citoplasmática.

- I. **Receptores tipo 1 (ALK1-ALK7)** que tienen un dominio rico en glicina-serina (GS) y su dominio cinasa permanece inactivo en ausencia de ligando.

En respuesta a las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), tres tipos de receptores tipo 1- BMPR1A/ALK3, BMPR1B/ALK6 y **receptor de activina A tipo I (ACVR1)/ALK2** ejercen un efecto osteogénico crucial para mantener la homeostasis ósea y condrogénesis.

- II. **Receptores tipo 2 (BMPR-II, ActRIIA, ActRIIB, TbrII y AMHRII)**, que no presentan el dominio GS y poseen activo el dominio cinasa de manera constitucional.

Papel de los receptores tipo I en la transducción de señales inducida por ligandos

Los ligandos de la familia TGF- β tienen múltiples actividades biológicas en diversas condiciones, incluido el desarrollo embrionario, el mantenimiento y la regeneración de tejidos, así como la muerte celular. Los ligandos se pueden clasificar en subgrupos osteogénicos y no osteogénicos según su actividad biológica in vivo.

BMP2, BMP4, BMP7 y BMP9 inducen la formación de hueso nuevo en los tejidos del músculo esquelético, mientras que los

TGF- β , la activina A y la miostatina no exhiben dicha actividad in vivo (Pierce & Perrien, 2021).

Las actividades osteogénicas y no osteogénicas se determinan mediante la unión al receptor tipo I, que activa las vías de señalización intracelular. Los ligandos osteogénicos se unen a ALK1, ALK2, ALK3 y/o ALK6 como receptores de tipo I e inducen la fosforilación de los factores de transcripción Smad1 y Smad5; Los ligandos no osteogénicos se unen a ALK4, ALK5 y/o ALK7 y activan Smad2 y Smad3 (Katagiri et al., 2021).

ALK2/ACVR1 es una proteína transmembrana que consta de 509 aminoácidos. Cuenta con varios dominios: un péptido señal (aminoácidos 1 a 20), un dominio de unión a ligando extramembrana (aminoácidos 21 a 123), un dominio transmembrana (aminoácidos 124–146), un dominio de glicina/serina (GS) (aminoácidos 178–207) y un dominio de cinasa intracelular (aminoácidos 208–502) (Katagiri et al., 2021). Funciona como receptor para miembros de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), especialmente para aquellos que inducen señalización osteogénica, como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Se ha demostrado que las BMP están involucradas en el desarrollo de diversos

organismos en los vertebrados, como huesos, cartílagos, cerebro, corazón, pulmones, riñones, colon y órganos reproductivos (Duminuco et al., 2024).

Fisiopatología

En condiciones normales, la activina A se une a los receptores ALK2/ACVR1 para bloquear la señalización intracelular activada por las BMP. El cambio en la función bioquímica de ALK2/ACVR1 basado en el ligando se ha propuesto como responsable de la patogénesis de la FOP (Katagiri et al., 2021).

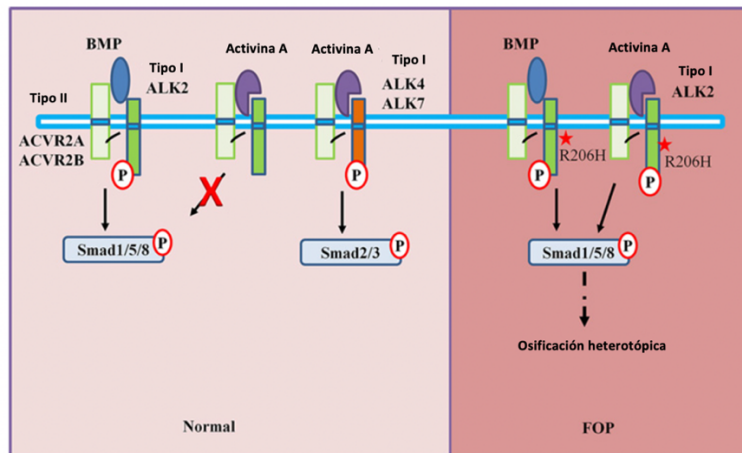


Figura 3. Diagrama de la red de señalización de BMP/Activina A en pacientes sanos y pacientes con FOP. BMP envía señales a través del receptor de tipo I de BMP ALK2, induciendo la fosforilación de Smad1/5, mientras que la Activina A induce la fosforilación de Smad2/3 a través de ALK4/7. BMP y Activina A comparten receptores de tipo II (ACVR2A, ACVR2B). Sin embargo, en FOP, la Activina A conduce a la fosforilación de Smad1/5 a través de ALK2 y desencadena la osificación heterotópica. P: fosforilación. Modificado de (Lin et al., 2019)

***ACVR1* y la vía BMP**

La mayoría de los pacientes con FOP presentan la misma variante patogénica en *ACVR1* (c.617G > A; R206H) y un cuadro clínico característico (descrito como FOP "clásica").

Todas las variantes patogénicas de *ACVR1* identificadas en individuos con FOP clásica o variantes ocurren en aminoácidos altamente conservados evolutivamente, lo que indica su importancia funcional (Srinivasan et al., 2024).

Muchos estudios han respaldado que la transducción de señales a través de la vía BMP está alterada en células de individuos con FOP, con disminución de la expresión de antagonistas de BMP, aumento de la fosforilación de los mediadores de señalización de la vía BMP (proteínas SMAD específicas de BMP y p38MAPK), tráfico desregulado de receptores de BMP, y aumento de la expresión de objetivos transcripcionales de BMP en ausencia de ligando de BMP exógeno (Kaplan et al., 2020).

Osteocondrogénesis

Se ha demostrado que *ACVR1* regula el destino condrogénico temprano en la FOP (Kaplan et al., 2020).

La osificación heterotópica en FOP parece proceder de una vía endocondral, con formación anormal de cartílago articular, artropatía precoz, placas de crecimiento displásicas y formación de osteocondromas (Towler & Shore, 2022).

La inflamación como desencadenante de osificación heterotópica

La osificación heterotópica en la FOP es episódica y está impulsada por la presencia de inflamación (Alessi Wolken et al., 2018).

La contribución del sistema inmunológico en la FOP es un importante foco de investigación. Las lesiones de osificación heterotópica albergan linfocitos, macrófagos y mastocitos (Wentworth et al., 2019).

Los pacientes con FOP sin datos clínicos de dolor presentan niveles significativamente elevados de interleucinas proinflamatorias, lo que indica que pueden estar en un estado inflamatorio constante (Matsuo et al., 2019). La condición hipóxica en los tejidos es otro factor que contribuye a la patogénesis de la FOP, posiblemente a través del factor 1-a inducible por hipoxia (HIF-1-a), que promueve la amplificación

de la señalización de BMP mediante la retención del receptor ALK2 en los endosomas (de Ruiter et al., 2021).

Vascularización en FOP

Las condiciones hipóxicas favorecen parcialmente la diferenciación de condrocitos al mantener la activación de la señalización de BMP e inducen la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo que promueve la infiltración de los vasos sanguíneos, lo que a su vez impulsa la formación de hueso endocondral (Morales-Piga et al., 2014). Las células endoteliales de pacientes con FOP parecen tener una expresión disminuida de cadherina endotelial vascular (VE) en condiciones inflamatorias, posiblemente debido a una interacción alterada de la señalización de cadherina endotelial vascular con el complejo del receptor ALK2 (de Ruiter et al., 2021).

Manifestaciones clínicas

Los pacientes con FOP presentan deformidad congénita del primer dedo de los pies (hallux valgus) que suele ser bilateral. Así como osificación heterotópica progresiva, ya sea espontánea o

en respuesta a un traumatismo de tejidos blandos (incluidos los traumatismos iatrogénicos por vacunas o procedimientos quirúrgicos).

Los episodios de inflamación de los tejidos blandos son recurrentes (brotes), que presentan dolor y pueden preceder a la osificación heterotópica localizada (Katagiri et al., 2018).

Brotes

Están caracterizados por inflamación localizada de tejidos blandos. Se asocian con dolor, pérdida de movilidad articular, rigidez y aumento de temperatura local (Al Mukaddam et al., 2022).

En algunos casos, los brotes no tienen un desencadenante identificable, pero muchos ocurren como resultado de un trauma físico (incluido un trauma menor) o enfermedades infecciosas. Los procedimientos invasivos, como las biopsias de tejidos blandos y especialmente la extirpación quirúrgica de hueso heterotópico no están indicados, ya que pueden desencadenar crecimiento de hueso heterotópico. La mayoría de los brotes se resuelven dentro de las 8 semanas posteriores al

inicio, con la excepción de los brotes de espalda y cadera, que pueden durar mucho más (Kannu & Levy, 2021).

Las lesiones tempranas de FOP (3 a 4 semanas) se caracterizan por un proceso inflamatorio pronunciado, seguido de una fase fibroproliferativa intensa asociada con angiogénesis y neovascularidad (Bauer et al., 2018).

Osificación heterotópica

La formación de hueso heterotópico (en tejidos blandos) puede manifestarse como una masa palpable. El inicio de la osificación heterotópica en individuos con la variante patogénica más común (c.617G>A [p.Arg206His]) es entre uno y diez años de edad, mientras que en pacientes con FOP atípica, el inicio de la osificación heterotópica puede ser posterior (Martín-García et al., 2021).

De acuerdo con el registro de la Asociación Internacional FOP (IFOPA), la media de edad de inicio de sintomatología (osificaciones heterotópicas) es a los 5.4 años, mientras que la edad media de diagnóstico de FOP es a los 7.5 años (De Brasi et al., 2021).

La osificación heterotópica puede ocurrir en cualquier ubicación, generalmente afecta regiones cercanas al esqueleto axial en las etapas tempranas y posteriormente afecta al esqueleto apendicular. Esto puede provocar una restricción del movimiento articular. La osificación de la mandíbula y el cuello puede afectar la deglución y el habla.

La osificación heterotópica que ocurre en la región torácica y submandibular puede restringir la función respiratoria. Además, la afectación costovertebral, la osificación de los músculos intercostales, paravertebrales y las aponeurosis, así como la deformidad espinal progresiva con cifoescoliosis, pueden provocar el síndrome de insuficiencia torácica, siendo la causa principal de mortalidad. Los pacientes con síndrome de insuficiencia torácica pueden presentar neumonía, hipoxemia, hipercapnia, hipertensión pulmonar e insuficiencia cardíaca derecha (Pignolo et al., 2022).

La osificación heterotópica puede diagnosticarse erróneamente como tumores u osteocondromas aislados, como los que se observan en los osteocondromas múltiples hereditarios, especialmente si no se reconocen las malformaciones del hallux (Adam et al., 2020).

Las anomalías típicas de la columna cervical en la FOP incluyen cuerpos vertebrales altos y estrechos, así como fusión de las articulaciones facetarias entre los cuerpos vertebrales C2 y C7. Es común la anquilosis de la articulación temporomandibular. En casos de discapacidad grave, la alimentación y la higiene bucal pueden verse gravemente afectadas.

Hasta el 50% de las personas con FOP experimentan pérdida de audición, generalmente conductiva, de inicio durante la niñez y progresa gradualmente.

Los síntomas neurológicos comúnmente reportados en FOP incluyen dolor neuropático y cefalea recurrentes, particularmente en pacientes mujeres pospúberes.

Los pacientes con FOP tienen un riesgo aproximadamente 3 veces mayor que la población general de presentar cálculos renales.

Las dificultades en la marcha y la incapacidad para compensar las limitaciones físicas contribuyen a las lesiones relacionadas con caídas en pacientes con FOP (Kannu & Levy, 2021).

Hallazgos de imagen

La ecografía prenatal puede identificar la deformidad de hallux valgus a partir de las 23 semanas de gestación.

Las radiografías de pies muestran acortamiento y malformación de los primeros metatarsianos, así como falange única displásica. Las radiografías de las áreas afectadas demuestran osificación heterotópica (formación de hueso extraóseo) (Adam et al., 2020).

Las radiografías simples sólo pueden detectar anomalías esqueléticas cuando están presentes y/o osificación heterotópica, el uso de imágenes por resonancia magnética (MRI) puede identificar osificación heterotópica en músculos de manera temprana.

Diagnóstico diferencial

Los diagnósticos diferenciales de la FOP son: osteosarcoma, osteocondromas múltiples hereditarios, heteroplasia ósea progresiva, metacondromatosis y la braquidactilia tipo B1.

También se debe considerar que las anomalías del hallux pueden representar malformaciones congénitas aisladas o asociadas con

sarcomas, tumores desmoides, fibromatosis juvenil agresiva, o linfedema.(De Brasi et al., 2021).

Relación genotipo-fenotipo

La variante patogénica c.617G>A (p.Arg206His) está asociada con el fenotipo de FOP clásico, que incluye malformaciones bilaterales de hallux valgus y osificación heterotópica de inicio temprano (Kaplan et al 2009) . Mientras variantes específicas de ganancia de función en el residuo de aminoácido 328 (p.Gly328Arg [c.982G>A y c.982G>C], p.Gly328Trp [c.982G>T] y p.Gly328Glu [c.983G> A]) se han asociado con un fenotipo característico que incluye defectos en extremidades, que pueden diagnosticarse erróneamente como un defecto de bandas amnióticas o un síndrome de braquidactilia, más comúnmente braquidactilia tipo B (Kaplan et al 2009).

	Manifestaciones clínicas	Variante patogénica
Características clásicas de FOP	-Malformación congénita de los primeros dedos de los pies. -Osificación heterotópica progresiva. -Osteocondromas tibiales mediales proximales. -Malformaciones de la columna cervical. -Hipoacusia conductiva. -Riesgo de hipercalciuria y nefrolitiasis. -Alopecia. Anormalidades en neuroimagen (especialmente en la región pontina).	c.617G>A (p.R206H)
Características adicionales de FOP ("FOP plus")	-Cuellos femorales cortos y anchos. -Malformaciones del pulgar.	c.617G>A (p.R206H) c.619C>G (p.Q207E)
FOP no clásica	-Cambios mínimos en el primer dedo del pie o sin alteraciones. -Glaucoma infantil. -Fenotipo marfanoide. -Criptorquidia.	c.617G>A (p.R206H) c.619C>G (p.Q207E) c.605G>T (p.R202I) c.1124G>C (p.R375P)
	-Malformaciones del pulgar. -Deterioro cognitivo. -Adelgazamiento difuso de cabello.	c.774G>C (p.R258S) c.774G>T (p.R258G)
	-Osificación heterotópica de aparición tardía -Ausencia de malformaciones características del primer dedo del pie.	c.774G>C (p.R258S) c.974G>C (p.G325A)
	-Malformaciones de los dedos de los pies mucho más graves que la forma clásica. -Movimiento limitado de los hombros, cuello, tórax, codos, caderas y articulaciones interfalángicas.	c.1067G>A (p.G356D)

Tabla 1. Clasificación de FOP según características clínicas y tipo de variante patogénica. Modificado de (Pignolo et al., 2020).

microRNAs (miRNAs)

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de RNA pequeños no codificantes que comprenden una gran familia de RNA de ~22 nucleótidos de longitud que han surgido como reguladores postranscripcionales clave de la expresión génica, incluido el crecimiento y diferenciación celular, así como la apoptosis (Saliminejad et al., 2019).

Se estima que los miRNAs regulan la expresión de aproximadamente dos tercios de los genes que codifican proteínas. Se les considera tanto objetivos de cambios epigenéticos (metilación del DNA) como reguladores de las modificaciones epigenéticas (Saliminejad et al., 2019).

En la mayoría de los organismos, hay un número limitado de miRNAs en comparación con el número de mRNAs y proteínas. Sin embargo, un miRNA puede regular cientos de mRNA y, como resultado, puede tener efectos sustanciales en las redes de expresión génica. Además, se pueden producir diferentes especies de miRNA maduros a partir de una única molécula de pre-miRNA (Gao et al., 2020).

Biogénesis de los miRNAs

Vía canónica

La mayoría de los genes de miRNA son transcritos por Pol II como RNA denominados pri-miRNA. En el núcleo, los pri-miRNA se escinden en aproximadamente 70 nucleótidos de estructura de tallo-asa llamados pre-miRNA (García-López et al., 2013). Este proceso se logra mediante un complejo que consta de Drosha y el gen de la región crítica del síndrome de DiGeorge 8 (DGCR8). Drosha es un miembro de las enzimas RNasa III que son un tipo de endorribonucleasa específica de RNA bicatenario. DGCR8 es una proteína de unión de RNA bicatenario que funciona como la subunidad no catalítica del complejo microprocesador (Nguyen, Park, Dang, Choi y Kim, 2018). Los pre-miRNA son posteriormente exportados al citoplasma por XPO5 y la proteína nuclear relacionada con Ras (RAN), que es una proteína de unión a GTP. En el citoplasma, los pre-miRNA se escinden en dsRNA. Esta escisión está mediada por Dicer, una enzima RNAasa III, que está asociada con la proteína de unión al RNA TAR (TRBP), una proteína de unión al RNA de doble cadena (Ha y Kim, 2014). El papel central en el silenciamiento del RNA lo desempeñan las proteínas de la familia argonauta (AGO).

El dúplex de miRNA se carga en la proteína AGO con la ayuda de proteínas chaperonas dependientes de ATP. Después de devolver el AGO a su conformación original, la cadena pasajera del dúplex de miRNA sale para producir miRNA maduro monocatenario (Bartel, 2018). Posteriormente AGO promueve el ensamblaje de un complejo de ribonucleoproteína denominado RISC, que media en el reconocimiento del mRNA objetivo (Saliminejad et al., 2019).

Vía no canónica

Recientemente, se han dilucidado varias vías alternativas para la biogénesis de miRNA. Varias clases diferentes de RNA son estructural y funcionalmente similares a los miRNA; sin embargo, omiten uno o más pasos en la vía de biogénesis canónica. Drosha y DGCR8 son esenciales para procesar miRNA canónicos y en su ausencia se pueden generar miRNA no canónicos (Abdelfattah, Park y Choi, 2014). Existen varias vías en la biogénesis de miRNA no canónicos, incluidas las vías independientes de Drosha y Dicer. En la vía del mirtrón, que es independiente de Drosha/DGCR8, los intrones son procesados por el espliceosoma hasta convertirse en mirtrones, posteriormente se pliegan en horquillas de pre-miRNA. Esta forma similar a pre-miRNA se

transfiere al citoplasma por XPO5 para continuar con las vías canónicas (Saliminejad et al., 2019)(Krol et al., 2010).

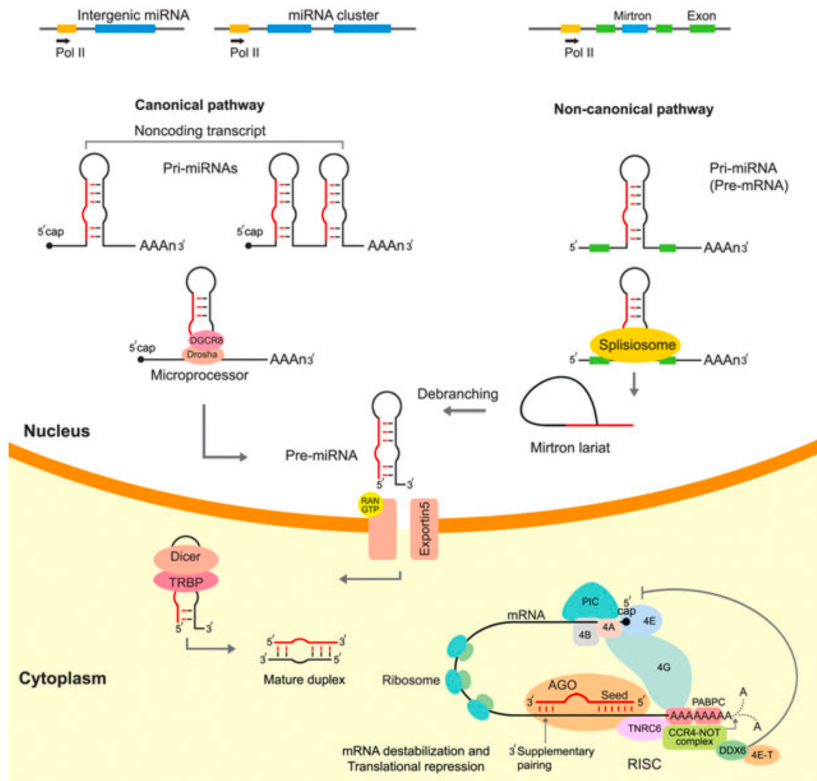


Figura 4. Descripción general de la biogénesis de los miRNAs.

Pol II: polimerasa II; RISC: complejo de silenciamiento inducido por RNA; TRBP: proteína de unión al RNA. Modificado de (Saliminejad et al., 2019).

miRNAs	Efecto en <i>ACVR1</i>	Vías de señalización asociadas
miR-148a	Correlación negativa. Línea celular HeLa Correlación negativa. Carcinoma hepatocelular Correlación negativa. Línea celular Eca 109 y Kyse510	BMP BMP/Wnt BMP/Wnt
miR-384	Correlación negativa. Línea celular PNAC-1. Cáncer pancreático. Correlación negativa. Líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231: cáncer de mama.	Proteína 1 asociada a filamentos de actina RNA antisentido 1 (AFAP1-AS1)/ miR-384/ACVR1 Wnt/ β -catenina
miR-208-3p	Correlación negativa. Células MC3T3-E1: diferenciación de osteoblastos	BMP2/Smad 1/5 y Smad 4
miR-193a-5p	Efecto protector comparable al inhibidor de ACVR1; células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC)	Vías relacionadas a ACVR1
miR137	Correlación negativa. Células del núcleo pulposo	AMPK/NF- κ B
miR-30c	Correlación negativa. Células hMADS, diferenciación de adipocitos	BMP-7, BMP-9
miR-130-a	Supresor tumoral. Células UTSCC- 7 y A431. Carcinoma cutáneo de células escamosas	BMP, SMAD1/5

Tabla 2. miRNAs con efecto sobre el gen *ACVR1* y vías de señalización asociadas. Modificado de (Nagar et al., 2023) .

JUSTIFICACIÓN

La fibrosdisplasia osificante progresiva (FOP) es una de las enfermedades más incapacitantes en el mundo. La FOP tiene un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia completa y expresividad variable. Afecta 1 a 1.7 de cada 2,000,000 recién nacidos vivos.

A pesar de tener identificado el gen causante de la enfermedad, los mecanismos moleculares subyacentes a la formación de hueso heterotópico no han sido completamente dilucidados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente, el análisis de los factores epigenéticos que regulan la expresión génica ha contribuido a comprender procesos biológicos en condiciones fisiológicas y patológicas. El papel de los miRNAs en la FOP no ha sido estudiado a profundidad.

Adicionalmente, se ha descrito una especie de RNA no codificante de naturaleza circular (circRNA), los cuales pueden funcionar como reservorios para los miRNAs, agregando un nivel extra de regulación de la expresión génica. El análisis del eje de interacción miRNA-circRNA-mRNA puede contribuir a comprender los procesos celulares que llevan a la formación de hueso heterotópico.

El Instituto Nacional de Rehabilitación LGII, se ha convertido en el centro nacional de referencia para el diagnóstico y manejo de la FOP. Actualmente contamos con un registro de 30 pacientes de diferentes estados de la república, lo que lo convierte en la

base de datos más extensa en todo el país. Hemos realizado publicaciones en revistas indexadas presentando datos clínicos y moleculares de los pacientes. De manera adicional, contamos con experiencia en el análisis de miRNAs, cicrRNAs y mRNAs en diversas patologías. Esto convierte al INR-LGII en un escenario ideal para esta investigación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. **Diseño de estudio.** Estudio de casos y controles.

2. **Población del estudio**

- Descripción del universo de trabajo. Se incluirán pacientes con diagnóstico molecular de FOP.

- Definición del grupo control. Grupo sin evidencia de la enfermedad, pareados por edad y sexo con los casos.

- Criterios de inclusión. Pacientes con diagnóstico molecular confirmado de FOP, con variante patogénica en el gen *ACVR1*.

- Criterios de eliminación. Se eliminarán las muestras de los participantes, casos y controles que cumplan con los criterios de inclusión, cuya muestra de RNA tenga un RIN menor a 7.

•Criterios de exclusión. Pacientes que cuenten con diagnóstico de otra displasia ósea y pacientes en los que no se confirme el diagnóstico molecular de FOP.

3. **Tamaño de la muestra:** Se realizará muestreo a conveniencia, no probabilístico de 5 individuos por grupo (5 casos y 5 controles). Considerando la baja prevalencia de la enfermedad.

Descripción de los procedimientos

Se invitó a participar a los pacientes que se encuentran en la base de datos del INR-LGII, e individuos control (individuos sanos que acudieron al banco de sangre del INR-LGII para realizar donación, de la misma edad y sexo de los pacientes) y se realizó la obtención del consentimiento informado aprobado por el comité de ética institucional.

Casos

Iniciales	Edad	Sexo	Mutación en ACVR1	Lugar de procedencia	Antecedente familiar de FOP
MVG_FOP	7 años	Femenino	ACVR1:c.617G>A (p.Arg206His)	Nuevo Laredo, Tamaulipas, México	No
RMFL_FOP	8 años	Masculino	ACVR1: c.617G>A (p.Arg206His)	Coyoacán, CDMX, México	No
JGRM_FOP	12 años	Masculino	ACVR1:c.617G>A (p.Arg206His)	Iztapalapa, CDMX, México	Si
VDY_FOP	18 años	Femenino	ACVR1:c.617G>A (p.Arg206His)	Querétaro, Querétaro, México	No
GMR_FOP	32 años	Femenino	ACVR1:c.617G>A (p.Arg206His)	Iztapalapa, CDMX, México	No

Tabla 3. Lista de casos con diagnóstico de FOP.

Controles

Iniciales	Edad	Sexo	Mutación en ACVR1	Lugar de procedencia	Antecedente familiar de FOP
AERM_S	7 años	Femenino	-	Tlalpan CDMX, México	No
ERGZ_S	7 años	Masculino	-	Tlalpan, CDMX, México	No
OJHA_S	13 años	Masculino	-	Tlalpan, CDMX, México	No
GRKO_S	18 años	Femenino	-	Tlalpan, CDMX, México	No
GMD_S	32 años	Femenino	-	Tlalpan, CDMX, México	No

Tabla 4. Lista de controles sanos.

Aislamiento y secuenciación de RNA

Para la identificación de los miRNAs expresados diferencialmente, se recolectaron 5 ml de sangre en tubos con EDTA de 5 pacientes y sus controles correspondientes pareados por edad y sexo. Luego, las muestras se sometieron a centrifugación en gradiente de densidad y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

El RNA total se extrajo utilizando el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo del proveedor.

Reactivo TRIzol®

Se procesaron las muestras dentro de las 2 primeras horas posteriores a la toma.

- 1.** Al tubo con EDTA, se agregó 1.5 ml del amortiguador TTS aprox. (10mM Tris, 1% tritón 100x, y 11% sacarosa), se homogenizó con vortex y se transfirió a un tubo de 15 ml.
- 2.** Se volvieron a agregar 2 ml del buffer TTS al tubo con EDTA, se homogenizó con vortex y se transfirió al mismo tubo de 15 ml.
- 3.** Se agregó buffer TTS al tubo de 15 ml, hasta tener un volumen de 11-13 ml y se homogenizó con vortex.

- 4.** Se centrifugó a 6,600 g durante 8 min a temperatura ambiente.
- 5.** Se decantó el sobrenadante sin perder el botón.
- 6.** Se adicionaron 6.0 ml del buffer TTS al pellet.
- 7.** Se homogenizó con vortex hasta resuspender el pellet.
- 8.** Se centrifugó a 6,600 g durante 8 min a temperatura ambiente.
- 9.** Se decantó el sobrenadante sin perder el pellet.
- 10.** Se hicieron lavados con el buffer TTS hasta apreciar el pellet limpio sin eritrocitos.
- 11.** Se agregaron 800 ul del buffer TTS para despegar el pellet.
- 12.** Se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 13,300 rpm durante 4 minutos a 4°C.
- 13.** Se retiró el sobrenadante con una punta.
- 14.** Se agregó 1.0 ml de Trizol.
- 15.** Se homogenizó con vortex.
- 16.** Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 17.** Se homogeneizó con vortex.
- 18.** Se agregaron 200 ul de cloroformo.
- 19.** Se homogeneizó con vortex.
- 20.** Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

- 21.** Se centrifugaron las muestras a 13,300 rpm durante 15 min a 4 ° C.
- 22.** Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml.
- 23.** Se agregó de isopropanol hasta llenar el tubo.
- 24.** Se precipitó a -20°C durante toda una noche.
- 25.** Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 26.** Se centrifugó a 13,300 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- 27.** Se decantó el sobrenadante.
- 28.** Se agregó 1.0 ml de etanol al 75%.
- 29.** Se centrifugó a 13,000 rpm durante 7 minutos a 4°C.
- 30.** Se decantó el sobrenadante.
- 31.** Se agregaron 500 ul de etanol al 75%.
- 32.** Se centrifugó a 13,300 rpm durante 4 minutos a 4°C.
- 33.** Se retiró el sobrenadante con punta.
- 34.** Se dejó secar unos minutos a temperatura ambiente.
- 35.** Se resuspendió el pellet con 22 ul agua libre de RNasa y Dnasa.

Para la verificación de calidad y cantidad del RNA se utilizó equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 2100

Bioanalyzer) , teniendo un Número de Integridad del RNA (RIN) mayor o igual a 7.

La verificación de pureza del RNA se realizó por método espectrofotométrico con Nanodrop®, obteniendo una relación 260/230 entre 1.8 - 2.2.

La cuantificación de RNA se llevó a cabo por método de fluorometría utilizando Qubit® Fluorometer 3.0.

El informe de calidad se muestra en la siguiente tabla.

ID Muestra	Vol. Final (ul)	RNA (ng/ul)	Cantidad Total (ug)	RNA (ng/ul) Stock
JGRMF_FOP	22	2	0.044	918
GMF_FOP	22	10	0.22	219
RMFL_FOP	22	12	0.264	159
MVG_FOP	18	59	1.062	51
VDY_FOP	22	39	0.858	282
OJHA_S	22	8	0.176	97
ERGZ_S	22	14	0.308	992
AERM_S	22	23	0.506	106
GRKO_S	22	8	0.176	378
GMD_S	22	5	0.11	439

Tabla 5. Informe de calidad de las muestras.

Preparación de bibliotecas de small RNA y secuenciación

La preparación de bibliotecas y secuenciación de small RNA se realizó utilizando NextSeq 2000, versión P2 100c, Single End (76), rendimiento (Gbp): 39.61, promedio %Q30: 88.72. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante (Illumina, Inc.) utilizando el kit TruSeq Small RNA.

ID Muestra	Índices	Total de Lecturas
JGRMF_FOP	CAGATC	8,432,089
GMF_FOP	ACTTGA	6,390,992
RMFL_FOP	ATCACG	25,654,527
MVG_FOP	CGATGT	25,941,569
VDY_FOP	TTAGGC	8,854,223
OJHA_S	GATCAG	12,561,757
ERGZ_S	ACAGTG	4,938,948
AERM_S	GCCAAT	10,196,037

Tabla 6. Análisis de calidad de secuenciación.

Análisis de expresión diferencial de miRNAs

Se realizó utilizando miRge3.0, una actualización del paquete Python para realizar un análisis integral de datos de secuenciación de small RNA, basándose en recuentos de secuenciación normalizados en RPM (lecturas por millón) contra

miRNAs conocidos utilizando DESeq2 para estimar la expresión diferencial entre las muestras.

El programa integra la prueba U de Mann-Whitney (prueba no paramétrica) para las comparaciones inferenciales de los dos grupos. El valor de P, se definió como estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$.

Los valores de Log2 positivos ($\text{Log2fc} \geq 1.5$) se tomaron como miRNAs expresados a la alza, de la misma forma con valores negativos ($\text{Log2fc} \leq -1.5$) como miRNAs expresados a la baja.

Análisis de enriquecimiento funcional

Se realizó utilizando el servidor web miRNet para identificar los genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados.

Posteriormente, para el análisis de enriquecimiento funcional y la determinación de las vías involucradas en la interacción de estos miRNAs se utilizó el servidor web g:Profiler, a partir de la lista de genes blanco.

Se seleccionaron las bases de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y WkiPathways. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p ajustado inferior a 0.05.

RESULTADOS

Datos clínicos

Se recolectaron 5 muestras de sangre de pacientes con diagnóstico de FOP confirmado por prueba molecular (todos los pacientes presentaron la misma variante patogénica en el gen *ACVR1*: c.617G>A) y fueron pareados por edad y sexo con 5 individuos sanos. El rango de edad de los pacientes fue de 7 a 32 años (Tabla 3).

Análisis de expresión diferencial de miRNAs

Se encontró que un total de 372 miRNAs se expresaron de manera diferencial (Tabla 1 del apartado de anexos) en PBMC de pacientes con FOP en comparación con controles sanos pareados por edad y sexo. De los cuales, se obtuvieron once miRNAs sobreexpresados con un valor significativo de $p < 0.05$ y ningún miRNA infraexpresado (Tabla 7, Figura 5).

miRNA	p.value	p.meaning	foldchange	log2FC
hsa-miR-1307-3p	0.0317	significativo	4.99129543	2.3194143
hsa-miR-1307-5p	0.0361	significativo	11.0920486	3.47145394
hsa-miR-15b-5p	0.0159	significativo	1.53365792	0.61697673
hsa-miR-199a-5p	0.0119	significativo	2.58376771	1.36947637
hsa-miR-22-3p	0.0317	significativo	2.13592405	1.09486035
hsa-miR-23a-3p/23b-3p	0.0079	significativo	1.83924292	0.87911204
hsa-miR-320a-3p/320b/320c/320d/320e	0.0159	significativo	2.43550056	1.28421831
hsa-miR-423-5p	0.0317	significativo	7.0921647	2.82622604
hsa-miR-484	0.0159	significativo	1.97532781	0.98209209
hsa-miR-532-5p	0.0212	significativo	13.110204	3.71261823
hsa-miR-93-5p	0.0317	significativo	2.0287938	1.02062224

Tabla 7. Lista de miRNAs diferencialmente expresados en PBMC de pacientes con FOP en comparación con controles sanos pareados por edad y sexo, con un valor de p estadísticamente significativo.

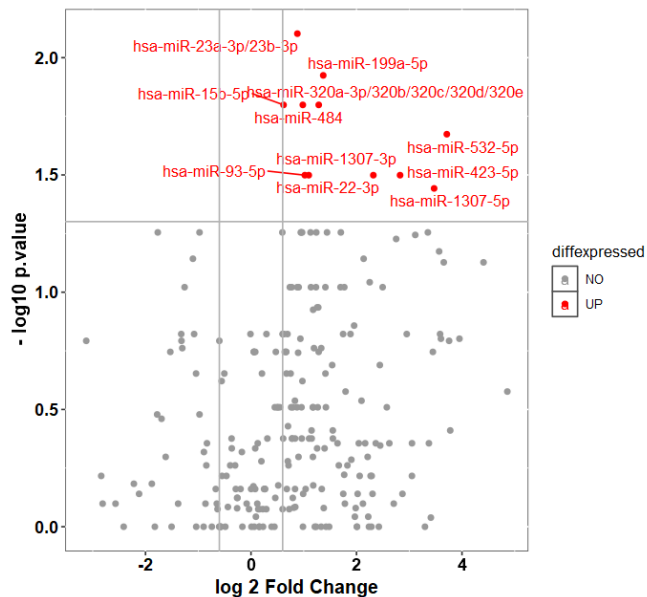


Figura 5. Gráfica de volcán que muestra los miRNAs diferencialmente expresados en PBMC de pacientes con FOP en comparación con controles sanos pareados por edad y sexo. Se muestran en color rojo los miRNAs sobreexpresados.

La siguiente gráfica (Figura 6) representa el análisis de componentes principales (PCA) de la distribución de ambos grupos. Los controles están representados por círculos azules y los pacientes con FOP por triángulos rojos.

Se observa que el grupo control está más concentrado alrededor del centro del gráfico, lo que sugiere que tiene menos variabilidad en comparación con el grupo FOP que se encuentra más disperso, lo que podría indicar una mayor heterogeneidad en las características medidas en este grupo, que pudieran ser explicadas por la edad y evolución clínica de cada uno de los pacientes.

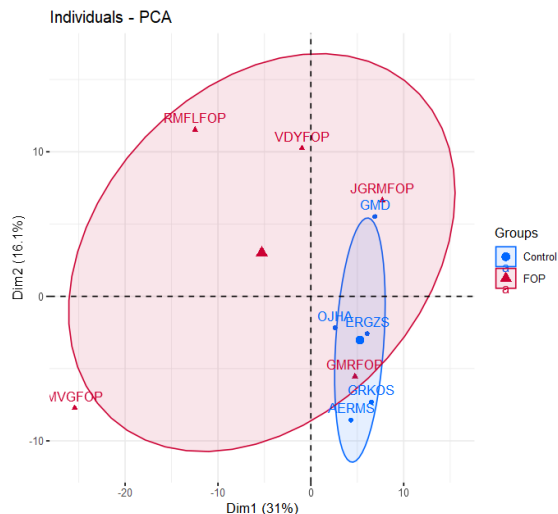


Figura 6. Gráfica de análisis de componentes principales que muestra la distribución del grupo de pacientes con FOP y los controles.

Análisis de enriquecimiento funcional

El análisis de enriquecimiento funcional se realizó utilizando el servidor web miRNet, donde se identificaron 3849 genes blanco. Para la determinación de las vías involucradas en la interacción de estos miRNAs se utilizó el servidor web g:Profiler, a partir de la lista de genes blanco.

Se obtuvieron un total de 60 vías de señalización relacionadas con los genes blanco utilizando la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y 57 por medio de WkiPathways.

Base de datos	Vía de señalización	Valor de p ajustado
KEGG	Vías en cancer	1.42866519838512E-10
KEGG	Infección por el virus 1 de la leuemia de células T humanas	1.53456570771397E-09
KEGG	Senescencia celular	8.63285702665586E-08
KEGG	Leucemia mieloide crónica	2.21888137908488E-07
KEGG	Cáncer pancreático	9.39460308288428E-07
KEGG	Autofagia (animal)	0.0000014890641492641200
KEGG	Cáncer colorectal	0.000003913563758371750
KEGG	Carcinogénesis viral	0.0000054804411786596100
KEGG	Vía de señalización Hippo	0.00000940706727535533
KEGG	Cáncer de mama	0.000013233867340058600
KEGG	Proteoglicanos en cáncer	0.000013237750891944200
KEGG	Carcinoma Hepatocelular	0.00001327352192083170
KEGG	Infección por el virus de Epstein-Barr	0.00001613425965771690
KEGG	Infección por salmonela	0.00005868793246646560

KEGG	Ciclo celular	0.00006174973187831130
KEGG	Vía de señalización p53	0.00008753294834363650
KEGG	Resistencia endócrina	0.00009026590742628930
KEGG	Cáncer gástrico	0.00011408263915437200
KEGG	Carcinoma de células renales	0.00011614477518227700
KEGG	Cáncer de próstata	0.0001671494336258320
KEGG	Hepatitis B	0.00019297680567034300
KEGG	Sarcoma de Kaposi asociado a infección por herpesvirus	0.00019514378086832200
KEGG	Vía de señalización HIF-1	0.00022443772373129100
KEGG	Cáncer pulmonar de células pequeñas	0.0003270565339405860
KEGG	Vía de señalización TNF	0.0006501649487868710
KEGG	Vía de señalización de la hormona tiroidea	0.0007150189606582610
KEGG	COVID-19	0.0008481243379756370
KEGG	Mitofagia (animal)	0.0009125485330643590
KEGG	Sarampión	0.001005867817547040
KEGG	Vía de señalización FoxO	0.0012145181457585900
KEGG	Cáncer pulmonar de células no pequeñas	0.0015907047104878300
KEGG	Vía de señalización MAPK	0.001951693038321240
KEGG	Shigelosis	0.0023844761797558900
KEGG	Resistencia a la insulina	0.0032163701826407000
KEGG	Vía de señalización de insulina	0.004407044660219310
KEGG	Cáncer de vejiga	0.005124742635675880
KEGG	Lípidos y aterosclerosis	0.00649871040676468
KEGG	Vías de señalización de regulación de células madre pluripotenciales	0.006508740425395420
KEGG	Procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico	0.006929815898188640
KEGG	Vía de señalización AGE-RAGE	0.007550980765772340
KEGG	Proteólisis mediada por ubiquitina	0.007999656447585940
KEGG	Infección por virus de papiloma humano	0.008286090238726690
KEGG	Resistencia a los inhibidores de tirosina cinasa de EGFR	0.012150120042489900

KEGG	Vía de señalización de la neurotrofina	0.012433957116180100
KEGG	Resistencia a los fármacos de platino	0.013826127020833700
KEGG	Adhesión focal	0.01424980573357260
KEGG	Vía de señalización TGF-beta	0.015176692423274600
KEGG	Vía de señalización ErbB	0.016535423052941900
KEGG	Cáncer de endometrio	0.016622790409242600
KEGG	Infección por Yersinia	0.017659778395584200
KEGG	Vía de señalización AMPK	0.018672576458115300
KEGG	Transporte nucleocitoplasmático	0.018799529451007200
KEGG	Endocitosis	0.02015183649228350
KEGG	Infección por Escherichia coli	0.02443641548487470
KEGG	Apoptosis	0.031242806602853600
KEGG	Melanoma	0.03746790093995140
KEGG	Ribosoma	0.038823995963342300
KEGG	Regulación del citoesqueleto de actina	0.04145129476673240
KEGG	Complejo represivo de Polycomb	0.041654744015418900
KEGG	Infección por virus de inmunodeficiencia humana 1	0.044937209782153600
WP	Vía de señalización VEGFA-VEGFR2	6.6021225725715E-12
WP	Respuesta al daño del DNA dependiente de ATM	1.48070625928471E-09
WP	Mesotelioma pleural	2.28512614936063E-09
WP	Vía de señalización TGF-beta	4.15956392341426E-07
WP	Proteínas ribosomales citoplasmáticas	0.000001297337209506790
WP	Adenocarcinoma pancreático	0.000001297337209506790
WP	Vía de señalización del receptor de andrógenos	0.0000013888025247013000
WP	Vía de señalización de glioblastoma	0.0000014751933578005300
WP	Red de señalización de la proteína MSP estimulante de macrófagos	0.0000014751933578005300
WP	Ciclo celular	0.00000309203319097448
WP	Inestabilidad cromosómica y de microsatélites en cáncer colorrectal	0.000006821287551403750
WP	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello	0.000010559837009704800

WP	Vía de señalización de insulina	0.000012434859368486900
WP	Retinoblastoma	0.000024424709636914100
WP	Hepatitis C y carcinoma hepatocelular	0.00005466667190758320
WP	Red relacionada con la apoptosis debido a la alteración de Notch3 en cáncer de ovario	0.000054958210102257500
WP	Control del ciclo celular de G1 a S	0.00012348513267717400
WP	Vía de señalización de gastrina	0.00029859617808315100
WP	Procesamiento de mRNA	0.000409689354321304
WP	Cáncer de mama	0.0006613081827498080
WP	Vías de señalización que contribuyen a las laminopatías LMNA	0.0013273156589382400
WP	Vía de señalización EGF-EGFR	0.0015878190611864300
WP	Vía reguladora de la proteína 8 similar a la angiopoyetina	0.0018041451615363300
WP	Señalización del receptor TGF beta	0.0021650962378821300
WP	Vía de señalización ErbB	0.0022115622907717600
WP	Resistencia a los inhibidores de la tirosina cinasa de EGFR	0.004054778830972520
WP	Señalización reguladora de TROP2	0.0044655530497287
WP	Vía integrada de cáncer	0.0044655530497287
WP	Vía de señalización IL 1	0.005201177702635440
WP	Cáncer pulmonar de células pequeñas	0.005721342206340870
WP	Melanoma	0.006318686458719880
WP	Respuesta al daño al DNA	0.008694337177773050
WP	Señalización del receptor TGF beta en displasias esqueléticas	0.009516373239946290
WP	Inhibidores de la traducción en células PDGFRA activadas crónicamente	0.010337993584851400
WP	Vía de señalización IL6	0.011256610752157500
WP	Cáncer de vejiga	0.012094245525777500
WP	Procesos de neovascularización	0.012781171580320100
WP	Miocarditis viral aguda	0.014606232549189600
WP	Adhesión focal	0.015531331664064900
WP	Vía de señalización de leptina	0.015998555041215800

WP	Regulación génica de células madre hematopoyéticas por el complejo GABP alfa beta	0.016854375253062600
WP	Vía de señalización de interleucina 11	0.016915825504181600
WP	Vía de señalización de estrógenos	0.019747032726867100
WP	Cáncer pulmonar de células no pequeñas	0.021410340714740200
WP	Infección por sarampión	0.02214311434919520
WP	Apoptosis	0.024574517782427700
WP	Cáncer pancreático	0.02768348732500500
WP	MECP2 y síndrome de Rett asociado	0.02840784415780870
WP	Cáncer endometrial	0.03445287294807890
WP	Vía de señalización de prolactin	0.037381680482168200
WP	Vías de señalización del carcinoma renal de células claras	0.03756274668148180
WP	Hepatitis B	0.0397098970986752
WP	Vía de señalización TNF alpha	0.040282513191633300
WP	Vía de señalización MAPK	0.04049287096349890
WP	Complejo represor polycomb 2 PRC2	0.04342815884629850
WP	Virus del ébola	0.046107396661570700
WP	Vía de señalización IL 5	0.04991075509212630

Tabla 8. Vías de señalización con un valor de p ajustado estadísticamente significativo ($p < 0.05$). KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), WP (WikiPathways).

Del total de vías de señalización obtenidas, se seleccionaron aquellas relacionadas con metabolismo óseo.

Base de datos	Vía de señalización	Interacciones de genes
KEGG	Ciclo celular	BUB1B,CCNA2,CDK6,CDKN1A,E2F2,PLK1,RBL1,YWHAZ,CCND1,E2F1,E2F3,E2F5,MAD2L1,S MAD4,MCM5,MDM2,MYC,RB1,TGFB1,WEE1,CDC16,PKMYT1,YWHAQ,ANAPC5,CDKN1C, GSK3B,SMAD3,TGFB2,CCND2,CCND3,CCNE1,CDK1,CDC25A,CDC27,CDK4,CHEK1,S MAD2,ORC4,PPP2R5C,YWHAH,CCNE2,ANAPC13,ABL1,MCM7,PPP2R5A,YWHAE,ORC6,AN APC7,ANAPC1,CDKN2A,PTTG1,SFN,CDC14B,SGO1
KEGG	Vía de señalización HIF-1	AKT1,CDKN1A,ERBB2,HIF1A,PDHA1,SLC2A1,TFRC,GAPDH,MKNK2,HK1,PDHB,PFKP,PIK3R 2,PRKCB,MAPK1,STAT3,ELOC,VEGFA,EGLN3,EDN1,HK2,NFKB1,PIK3CD,BCL2,IFNG,IFNGR2 ,INSR,PIK3R1,RPS6,RPS6KB1,CUL2,AKT3,CAMK2D,ENO1,IGF1R,PFKL,ELOB,VHL,ALDOC,PF KFB3,IL6R
KEGG	Vía de señalización TNF	AKT1,MMP14,XIAP,CREB1,CYLD,ICAM1,IRF1,JUN,MMP3,NFKBIA,PIK3R2,MAPK1,MAPK9, CCL5,RPS6KA4,MAP3K14,RPS6KA5,DNM1L,JAG1,EDN1,IKKBK,JUNB,LIF,NFKB1,PIK3CD,PT GS2,MMP9,PIK3R1,MAP2K3,MAP2K4,MAP3K7,FADD,SOC3,BAG4,AKT3,TAB2,CASP7,MA P2K7,CXCL2,TAB1,CEBPB
KEGG	Vía de señalización de la hormona tiroidea	AKT1,ESR1,HIF1A,PRKACA,SLC2A1,NCOA1,ATP1B3,CCND1,MDM2,MYC,PDPK1,PFKFB2,PF KP,PIK3R2,PRKACB,PRKCB,MAPK1,NCOA3,KAT2B,MED17,MED16,MED13L,MED12L,GSK3 B,KRAS,PIK3CD,SLC16A10,ATP2A2,FOXO1,NOTCH2,PIK3R1,SLC9A1,THRA,AKT3,ACTB,ATP 1A1,ATP1A2,NOTCH3,PFKL,RXR,NCOR1,ACTG1,PLCB1
KEGG	Vía de señalización MAPK	AKT1,BDNF,CSF1R,ERBB2,ERBB3,MECOM,GRB2,HSPA1B,MAX,NTRK2,PRKACA,CRK,DUSP 2,DUSP8,ELK4,EREG,GNA12,MKNK2,NR4A1,HSPA8,IGF2,JUN,MAP3K3,MAP3K4,MYC,PDG FB,PPP3R1,PRKACB,PRKCB,MAPK1,MAPK9,TGFB1,TGFB2,VEGFA,MAPKAPK5,RPS6KA4, MAP3K14,MAP3K13,RPS6KA5,MAP3K2,RRAS2,IRAK4,IKKBK,KRAS,MAP3K9,MAP3K11,NF KB1,TGFB2,TGFB1,MAP4K3,CRKL,FGF2,FGF5,FGFR4,INSR,KDR,PAK2,PPM1A,MAP2K3,M AP4K2,RPS6KA3,MAP2K4,MAP3K7,MAPKAPK2,AKT3,TAB2,GNG12,TAOK1,CDC42,FLNA,FL NB,IGF1R,STMN1,MAP3K10,MAP2K7,RAC3,SRF,TAOK2,RASGRP3,TAB1,ARRB2,NFKB2,PA K1,MAPK8IP3,FGFR1
KEGG	Vía de señalización de insulina	AKT1,GRB2,PRKACA,CRK,FASN,MKNK2,HK1,PDE3B,PDPK1,PIK3R2,PRKACB,PRKAR1A,PRK CI,MAPK1,MAPK9,PYGL,SLC2A4,TRIP10,PPP1R3B,GSK3B,HK2,IKKBK,KRAS,PIK3CD,CRKL,F OXO1,FLOT2,INSR,PHKA1,PIK3R1,PPP1CB,PPP1CC,PRKAA1,PRKAR2A,RPS6,RPS6KB1,SOC3 ,AKT3,PHKB,PYGB,SREBF1,IRS4,IRS2,FLOT1,CALM3
KEGG	Vías de señalización de regulación de células madre pluripotenciales	AKT1,BMPR1B,GRB2,TBX3,TCF7,WNT1,ACVR1C,ACVR1B,BMPR2,DVL3,JAK1,SMAD4,SMA D5,MYC,PIK3R2,MAPK1,REST,SKIL,STAT3,WNT2B,FZD9,RIF1,GSK3B,KRAS,LIF,SMAD3,PIK3 CD,WNT2,FZD4,FZD6,ACVR2A,FGF2,FGFR4,JARID2,SMAD2,PIK3R1,TCF3,AXIN2,AKT3,DVL 2,IGF1R,MEIS1,AXIN1,ZFH3,DLX5,FGFR1
KEGG	Vía de señalización de neurotrofina	AKT1,BDNF,GRB2,NTRK2,CRK,FOXO3,GAB1,JUN,MAP3K3,NFKBIA,PDPK1,PIK3R2,MAPK1, MAPK9,RPS6KA5,FRS2,IRAK4,GSK3B,IKKBK,KRAS,NFKB1,PIK3CD,ARHGDI3,BAX,BCL2,CRK L,PIK3R1,PRKCD,RPS6KA3,MAPKAPK2,AKT3,PRDM4,ABL1,CAMK2D,CDC42,MAP2K7,YWH AE,SH2B1,CALM3
KEGG	Vía de señalización TGF-beta	BMP6,BMP7,BMPR1B,RBL1,SP1,TFRC,ACVR1C,ACVR1B,BMP2,BMP8B,BMPR2,E2F5,SMA D4,SMAD5,SMAD6,SMAD7,MYC,NBL1,MAPK1,SKI,SKIL,TGFB1,TGFB2,ZFYVE9,RGMB,SM AD3,TGFB2,TGFB1,ACVR2A,IFNG,SMAD2,RPS6KB1,BAMBI,SMURF1,NEO1,NCOR1

WP	Vía de señalización VEGFA VEGFR2	AKT1,BSG,GRB2,HMGB1,CYR61,MMP14,MYO6,SRPK1,RBM39,HDAC4,CYCS,BIRC5,RHOC,CCND1,BMP2,CAV1,CREB1,CRK,EIF4G2,F3,FOXO3,GAB1,GAPDH,GRSF1,NR4A1,ICAM1,CXCL8,ITGB1,JUN,LIMK1,DNAJB9,MDM2,MYH9,NFKBIA,OCRL,PDPK1,PIK3R2,PRKCB,PRKCI,MAPK1,MAPK9,PSMD4,PSMD11,RPL27,SET,SOD2,STAT3,ELOC,TFAM,VEGFA,EEA1,MAPKAPK5,RPS6KA5,QKI,HERPUD1,UBAP2L,TXNIP,TRAF3IP2,FRS2,DNAJB4,ACOT9,FXJ1,SND1,TMOD3,PBXIP1,FMNL3,JAG1,CLTC,ERN1,ETS1,GSK3B,NFKB1,PTGS2,SLC8A1,SMARCA2,KL,ATF6,RND1,BCL2,CALU,DECR1,FOXO1,DNAJA1,KDR,AFDN,PAK2,PGD,PIK3R1,PRKAA1,PRKCD,MAP2K3,PTPRJ,RPS6,RPS6KB1,MAP2K4,TPM3,VAV2,VCL,FADD,SYNJ1,LRRFIP2,MAPKAPK2,PDIA6,HYOU1,KANK1,PRRC2C,C15ORF39,CHAC1,AMOT,ABL1,ADAM10,BCL2L1,CAPZB,CDC42,CFL1,FGF,FLII,FLNB,HSP90AA1,P4HB,PPM1G,MAP2K7,RPL5,RPLP2,SRF,ELOA,TKT,YWHAE,TAOK2,STIP1,FAF1,BRD4,SPIRE1,AKT1S1,ACTG1,ARRB2,ATP6V1E1,AP2S1,EPB41,PAK1,PTMA,RPL18A,SRP54,NDRG1,PABPC1,FHOD1,EPN1,TPCN2
----	----------------------------------	--

Tabla 9. Vías de señalización relacionadas con metabolismo óseo. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), WP (WikiPathways).

DISCUSIÓN

El papel de los miRNAs en la FOP no ha sido estudiado a profundidad. Hasta el momento se han publicado muy pocos estudios de estas interacciones epigenéticas en pacientes con la enfermedad.

En el presente estudio se identificaron 11 miRNAs sobreexpresados en PBMC de pacientes con diagnóstico de FOP en comparación con los controles: hsa-miR-1307-3p, hsa-miR-1307-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-23a-3p/23b-3p, la familia hsa-mir320a3p/320b/320c/320d/320e, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-532-5p y hsa-miR-93-5p.

En 2023 Schoenmaker y colaboradores estudiaron los cambios transcriptómicos inducidos por la activina A durante la formación de osteoclastos. Los monocitos CD14 de seis pacientes con FOP y seis controles sanos pareados por edad y sexo se diferenciaron en osteoclastos en ausencia o presencia de activina A. Describieron 1480 genes expresados diferencialmente en los dos grupos. El análisis de enriquecimiento reveló vías vinculadas a la diferenciación celular y a la inflamación (Schoenmaker et al., 2023) (Lin et al., 2019).

En un estudio previo se encontró que el miR-148a podría inhibir la expresión del mRNA de la familia de genes inhibidores de la unión al DNA, suprimiendo así la vía de señalización de BMP, convirtiéndolo en un mediador importante de *ACVR1* (Song et al., 2012).

Debido a que son pocos los estudios previos realizados en pacientes con FOP que describan la expresión de miRNAs, se buscaron también estudios relacionados al desarrollo óseo y sus alteraciones (Taipaleenmäki, 2018), por ejemplo Dai y colaboradores describieron la expresión diferencial de 13

miRNAs en células MG-63 con la inhibición de la endonucleasa apurínica/apirimídica 1 (APE1), de estos, miR-451, miR-1290, miR-765, miR-483-5p, miR-513a-5p, hsa-miR-129-5p y hsa-miR-31 se encontraron sobreexpresados, mientras que miR-29b, miR-197, let-7b, miR-324-5p, let-7i y miR-484 se encontraron infraexpresados, lo que sugiere que APE1 es un regulador de miRNAs involucrado en osteosarcoma (Zhang et al., 2015). En el presente estudio encontramos al miR-484 diferencialmente sobreexpresado, contrario a lo descrito para osteosarcoma.

En cuanto a las vías de señalización resultado del análisis de enriquecimiento funcional descritas en este estudio destacan las relacionadas con cáncer, ciclo celular, HIF-1, TNF, MAPK, insulina, TGF-beta, VEGFA, VEGFR2.

Se encuentra descrito en la literatura que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) liberado tras la remodelación ósea, juega un papel importante en la osificación heterotópica (Xu et al., 2022).

HIF-1 α , o factor inducible por hipoxia 1-alfa, es una proteína que desempeña un papel crucial en la respuesta celular a la hipoxia

(Yang et al., 2021). Promueve la angiogénesis, supervivencia celular y diferenciación osteogénica, todos estos procesos críticos en la formación de hueso heterotópico (Wang et al., 2024).

El factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) posee actividad proangiogénica y proosteogénica que resulta crucial durante el desarrollo óseo normal, modelos murinos demuestran que las lesiones de osificación heterotópica son altamente vasculares y que el VEGFA es fundamental para la formación de hueso heterotópico (Hwang et al., 2019).

CONCLUSIONES

En este estudio se encontró un perfil de sobreexpresión de 11 miRNAs estadísticamente significativos en pacientes con FOP en comparación con los controles sanos. El único estudio previo con el que se cuenta es del 2023, donde se realizó el perfil de expresión diferencial en monocitos CD14 de pacientes con FOP y controles sanos, donde el análisis de enriquecimiento funcional dio como resultado vías de señalización relacionadas con diferenciación celular e inflamación, mientras que en nuestro

estudio destacan las vías de señalización relacionadas con la osificación heterotópica.

Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a la formación de hueso heterotópico no han sido completamente dilucidados, por lo que es necesario un conocimiento profundo de las vías de señalización involucradas para la posible prevención y el tratamiento efectivos de las osificaciones heterotópicas. Se espera que este tipo de estudios sean la base para que los miRNAs identificados y las vías de señalización relacionadas sirvan para proponer nuevos blancos terapéuticos para mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Expectativas a futuro:

Dentro de los objetivos específicos del presente trabajo se encuentra la creación de las redes de interacción miRNA-circRNA-mRNA de pacientes con FOP y controles sanos. Para esta primera etapa del estudio, por cuestiones relacionadas a tiempo y disponibilidad de recursos sólo fue posible realizar la secuenciación de small RNA, pero se tiene previsto en un futuro analizar mediante secuenciación de RNA (RNAseq) la expresión de mRNA en ambos grupos de estudio, analizar mediante

microarreglos específicos para circRNA (Arraystar Human Circular RNA Array) la expresión de circRNA en ambos grupos de estudio para posteriormente identificar los transcritos con expresión diferencial y realizar análisis de enriquecimiento de funciones biológicas para crear las redes de interacción miRNA-circRNA-mRNA.

REFERENCIAS

- Adam, M. P., Feldman, J., & Mirzaa, G. M. (2020a). *Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Synonyms: Myositis Ossificans Progressiva, Progressive Ossifying Myositis, ACVR1-Related Fibrodysplasia Ossificans Progressiva*.
- Akyuz, G., Gencer-Atalay, K., & Ata, P. (2019). Fibrodysplasia ossificans progressiva: Lessons learned from a rare disease. In *Current Opinion in Pediatrics* (Vol. 31, Issue 6, pp. 716–722). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000802>
- Al Mukaddam, M., Toder, K. S., Davis, M., Cali, A., Liljesthröm, M., Hollywood, S., Croskery, K., Grandoulier, A. S., Böing, E. A., Whalen, J. D., & Kaplan, F. S. (2022). The impact of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) on patients and

their family members: results from an international burden of illness survey. *Expert Review of Pharmacoeconomics and Outcomes Research*, 22(8), 1199–1213.
<https://doi.org/10.1080/14737167.2022.2115360>

Alessi Wolken, D. M., Idone, V., Hatsell, S. J., Yu, P. B., & Economides, A. N. (2018). The obligatory role of Activin A in the formation of heterotopic bone in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. In *Bone* (Vol. 109, pp. 210–217). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.06.011>

Bauer, A. H., Bonham, J., Gutierrez, L., Hsiao, E. C., & Motamedi, D. (2018). Fibrodysplasia ossificans progressiva: a current review of imaging findings. In *Skeletal Radiology* (Vol. 47, Issue 8, pp. 1043–1050). Springer Verlag.
<https://doi.org/10.1007/s00256-018-2889-5>

Benesova, S., Kubista, M., & Valihrach, L. (2021). Small rna-sequencing: Approaches and considerations for mirna analysis. In *Diagnostics* (Vol. 11, Issue 6). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/diagnostics11060964>

De Brasi, D., Orlando, F., Gaeta, V., De Liso, M., Acquaviva, F., Martemucci, L., Mastrominico, A., & Di Rocco, M. (2021).

Fibrodysplasia ossificans progressiva: A challenging diagnosis. *Genes*, 12(8).

<https://doi.org/10.3390/genes12081187>

de Ruiter, R. D., Smilde, B. J., Pals, G., Bravenboer, N., Knaus, P., Schoenmaker, T., Botman, E., Sánchez-Duffhues, G., Pacifici, M., Pignolo, R. J., Shore, E. M., van Egmond, M., Van Oosterwyck, H., Kaplan, F. S., Hsiao, E. C., Yu, P. B., Bocciardi, R., De Cunto, C. L., Longo Ribeiro Delai, P., ... Eekhoff, E. M. W. (2021). Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: What Have We Achieved and Where Are We Now? Follow-up to the 2015 Lorentz Workshop. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.732728>

Duminuco, A., Chifotides, H. T., Giallongo, S., Giallongo, C., Tibullo, D., & Palumbo, G. A. (2024). ACVR1: A Novel Therapeutic Target to Treat Anemia in Myelofibrosis. In *Cancers* (Vol. 16, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers16010154>

Gao, Y., Patil, S., & Qian, A. (2020). The role of micrnas in bone metabolism and disease. In *International Journal of*

Molecular Sciences (Vol. 21, Issue 17, pp. 1–23). MDPI AG.

<https://doi.org/10.3390/ijms21176081>

Huang, J., Borchert, G. M., Dou, D., Jun, , Luke, (, Huan,), Lan, W., Tan, M., & Wu, B. (n.d.). *Bioinformatics in MicroRNA Research*. <http://www.springer.com/series/7651>

Hwang, C., Marini, S., Huber, A. K., Stepien, D. M., Sorkin, M., Loder, S., Pagani, C. A., Li, J., Visser, N. D., Vasquez, K., Garada, M. A., Li, S., Xu, J., Hsu, C. Y., Yu, P. B., James, A. W., Mishina, Y., Agarwal, S., Li, J., & Levi, B. (2019). Mesenchymal VEGFA induces aberrant differentiation in heterotopic ossification. *Bone Research*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41413-019-0075-6>

Kaliya-Perumal, A. K., Carney, T. J., & Ingham, P. W. (2020). Fibrodysplasia ossificans progressiva: Current concepts from bench to bedside. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 13(9). <https://doi.org/10.1242/DMM.046441>

Kannu, P., & Levy, C. E. (2021). Improving the Diagnosis of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Journal of Pediatrics*, 232, S3–S8. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2021.02.036>

Kaplan, F. S., Al Mukaddam, M., Stanley, A., Towler, O. W., & Shore, E. M. (2020). Fibrodysplasia ossificans progressiva

(FOP): A disorder of osteochondrogenesis. In *Bone* (Vol. 140). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115539>

Katagiri, T., Tsukamoto, S., & Kuratani, M. (2018). Heterotopic bone induction via BMP signaling: Potential therapeutic targets for fibrodysplasia ossificans progressiva. In *Bone* (Vol. 109, pp. 241–250). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.07.024>

Katagiri, T., Tsukamoto, S., & Kuratani, M. (2021). Accumulated knowledge of activin receptor-like kinase 2 (ALK2)/activin a receptor, type 1 (ACVR1) as a target for human disorders. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070736>

Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 11, Issue 9, pp. 597–610). <https://doi.org/10.1038/nrg2843>

Lin, H., Shi, F., Gao, J., & Hua, P. (2019). The role of Activin A in fibrodysplasia ossificans progressiva: A prominent mediator. In *Bioscience Reports* (Vol. 39, Issue 8). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BSR20190377>

- Liu, J., Yao, Y., Huang, J., Sun, H., Pu, Y., Tian, M., Zheng, M., He, H., & Li, Z. (2022). Comprehensive analysis of lncRNA-miRNA-mRNA networks during osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08646-x>
- Martín-García, D., Towler, O. W., Xu, M., Alfonso-Hernández, O., Oliveira, P. R., Alonso-Clavo, M., Shore, E. M., & Kaplan, F. S. (2021). Nonclassic fibrodysplasia ossificans progressiva: A child from Angola with an ACVR1G328E variant. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 185(8), 2572–2575. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62253>
- Matsuo, K., Chavez, R. D., Barluet, E., & Hsiao, E. C. (2019). Inflammation in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva and Other Forms of Heterotopic Ossification. In *Current Osteoporosis Reports* (Vol. 17, Issue 6, pp. 387–394). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00541-x>
- Morales-Piga, A., Bachiller-Corral, F. J., & Sánchez-Duffhues, G. (2014). Is “fibrodysplasia ossificans progressiva” a vascular disease? A groundbreaking pathogenic model. In *Reumatologia Clinica* (Vol. 10, Issue 6, pp. 389–395).

Ediciones

Doyma,

S.L.

<https://doi.org/10.1016/j.reuma.2014.05.001>

Nagar, G., Mittal, P., Gupta, S. R. R., Pahuja, M., Sanger, M., Mishra, R., Singh, A., & Singh, I. K. (2023). Multi-omics therapeutic perspective on ACVR1 gene: From genetic alterations to potential targeting. *Briefings in Functional Genomics*, 22(2), 123–142. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elac026>

Pierce, J. L., & Perrien, D. S. (2021). Do Interactions of Vitamin D3 and BMP Signaling Hold Implications in the Pathogenesis of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva? In *Current Osteoporosis Reports* (Vol. 19, Issue 3, pp. 358–367). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11914-021-00673-z>

Pignolo, R. J., Bedford-Gay, C., Cali, A., Davis, M., Delai, P. L. R., Gonzales, K., Hixson, C., Kent, A., Newport, H., Robert, M., Scott, C., & Kaplan, F. S. (2022). Current challenges and opportunities in the care of patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP): an international, multi-stakeholder perspective. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02224-w>

- Pignolo, R. J., Wang, H., & Kaplan, F. S. (2020). Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP): A Segmental Progeroid Syndrome. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00908>
- Ravazzolo, R., & Bocciardi, R. (2021). Genomic context and mechanisms of the ACVR1 mutation in fibrodysplasia ossificans progressiva. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 2, pp. 1–12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020154>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Issue 5, pp. 5451–5465). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Schoenmaker, T., Zwaak, J., Loos, B. G., Volckmann, R., Koster, J., Eekhoff, E. M. W., & de Vries, T. J. (2023). Transcriptomic Differences Underlying the Activin-A Induced Large Osteoclast Formation in Both Healthy Control and Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Osteoclasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076822>

- Song, H., Wang, Q., Wen, J., Liu, S., Gao, X., Cheng, J., & Zhang, D. (2012). ACVR1, a therapeutic target of fibrodysplasia ossificans progressiva, is negatively regulated by miR-148a. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 2063–2077. <https://doi.org/10.3390/ijms13022063>
- Srinivasan, D., Arostegui, M., Goebel, E. J., Hart, K. N., Aykul, S., Lees-Shepard, J. B., Idone, V., Hatsell, S. J., & Economides, A. N. (2024). How Activin A Became a Therapeutic Target in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. In *Biomolecules* (Vol. 14, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biom14010101>
- Taipaleenmäki, H. (2018). Regulation of Bone Metabolism by microRNAs. In *Current Osteoporosis Reports* (Vol. 16, Issue 1). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0417-0>
- Towler, O. W., & Shore, E. M. (2022). BMP signaling and skeletal development in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). In *Developmental Dynamics* (Vol. 251, Issue 1, pp. 164–177). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/dvdy.387>

- Valer, J. A., Sánchez-De-Diego, C., Pimenta-Lopes, C., Rosa, J. L., & Ventura, F. (2019). ACVR1 function in health and disease. In *Cells* (Vol. 8, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8111366>
- Wang, H., Kaplan, F. S., & Pignolo, R. J. (2024). The HIF-1 α and mTOR Pathways Amplify Heterotopic Ossification. *Biomolecules*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/biom14020147>
- Wentworth, K. L., Masharani, U., & Hsiao, E. C. (2019). Therapeutic advances for blocking heterotopic ossification in fibrodysplasia ossificans progressiva. In *British Journal of Clinical Pharmacology* (Vol. 85, Issue 6, pp. 1180–1187). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/bcp.13823>
- Xu, Y., Huang, M., He, W., He, C., Chen, K., Hou, J., Huang, M., Jiao, Y., Liu, R., Zou, N., Liu, L., & Li, C. (2022). Heterotopic Ossification: Clinical Features, Basic Researches, and Mechanical Stimulations. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.770931>

- Yang, Z., Liu, D., Guan, R., Li, X., Wang, Y., & Sheng, B. (2021). Potential genes and pathways associated with heterotopic ossification derived from analyses of gene expression profiles. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02658-1>
- Zhang, J., Yan, Y. G., Wang, C., Zhang, S. J., Yu, X. H., & Wang, W. J. (2015). MicroRNAs in osteosarcoma. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 444, pp. 9–17). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.025>

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de FOP según características clínicas y tipo de variante patogénica.

Tabla 2. miRNAs con efecto sobre el gen *AVCR1* y vías de señalización asociadas.

Tabla 3. Lista de casos con diagnóstico de FOP.

Tabla 4. Lista de controles sanos.

Tabla 5. Informe de calidad de las muestras.

Tabla 6. Análisis de calidad de secuenciación.

Tabla 7. Lista de miRNAs diferencialmente expresados en PBMC de pacientes con FOP en comparación con controles sanos pareados por edad y sexo, con un valor de p estadísticamente significativo.

Tabla 8. Vías de señalización con un valor de p ajustado estadísticamente significativo ($p < 0.05$). KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), WP (WikiPathways).

Tabla 9. Vías de señalización relacionadas con metabolismo óseo. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), WP (WikiPathways).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gen *ACVR1*.

Figura 2. Representación esquemática de los dominios y localizaciones de las variantes patogénicas en el gen *ACVR1*.

Figura 3. Diagrama de la red de señalización de BMP/Activina A en pacientes sanos y pacientes con FOP.

Figura 4. Descripción general de la biogénesis de los miRNAs.

Figura 5. Gráfica de volcán que muestra los miRNAs diferencialmente expresados en PBMC de pacientes con FOP en comparación con controles sanos pareados por edad y sexo. Se muestran en color rojo los miRNAs sobreexpresados.

Figura 6. Gráfica de análisis de componentes principales que muestra la distribución del grupo de pacientes con FOP y los controles.

ANEXOS

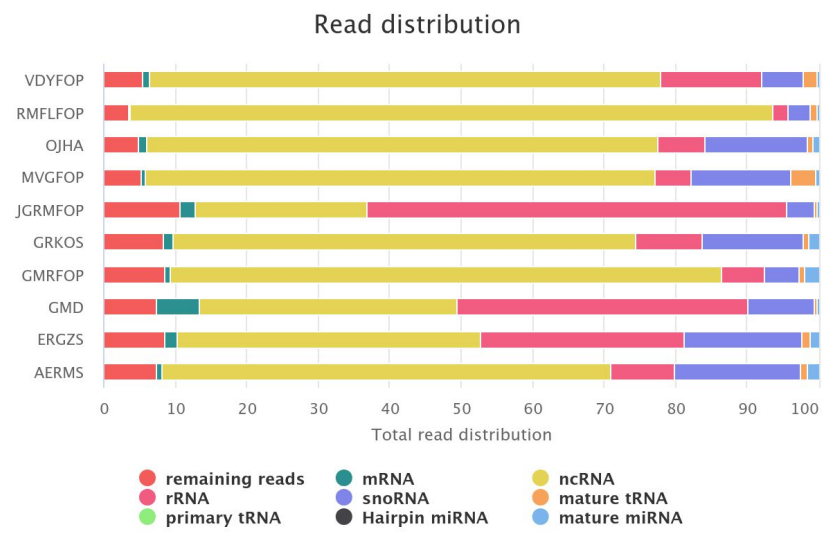


Figura 1. Distribución de lecturas para cada muestra en el análisis de expresión diferencial de miRNAs.

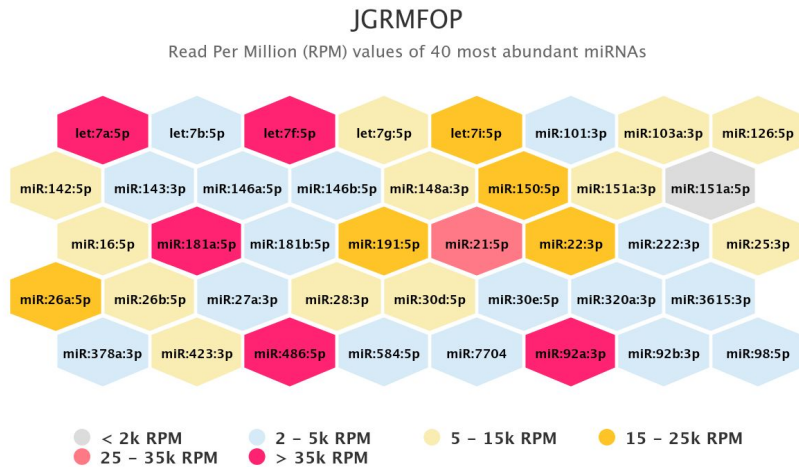


Figura 2. Mapa de mosaicos con los 40 miRNAs más abundantes en el paciente JGRMFOP y número de lecturas por millón (RPM).

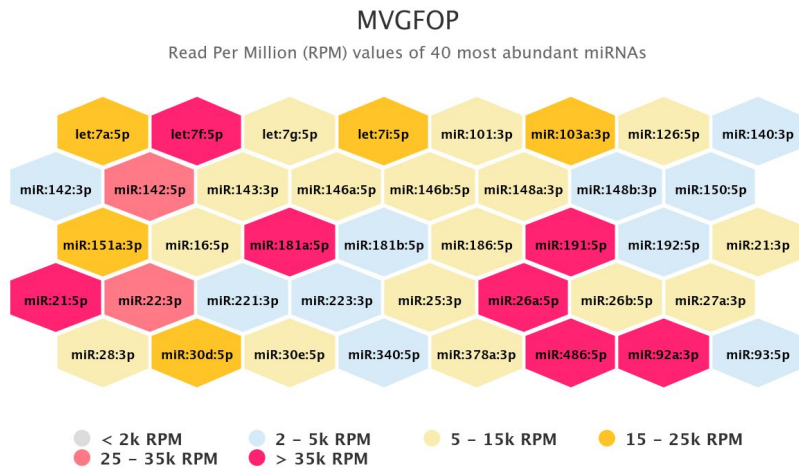


Figura 3. Mapa de mosaicos con los 40 miRNAs más abundantes en el paciente MVGFOP y número de lecturas por millón (RPM).

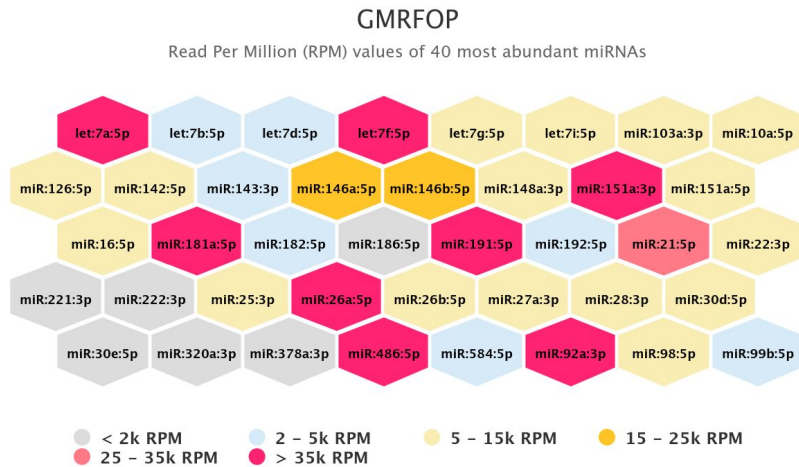


Figura 4. Mapa de mosaicos con los 40 miRNAs más abundantes en el paciente GMRFOP y número de lecturas por millón (RPM).

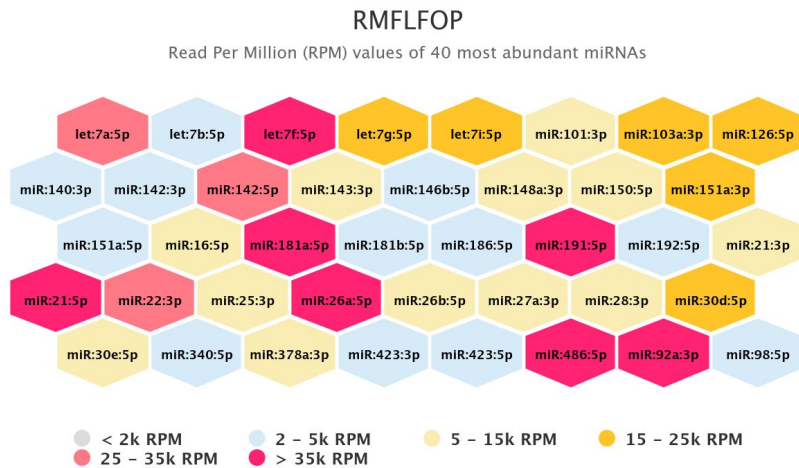


Figura 5. Mapa de mosaicos con los 40 miRNAs más abundantes en el paciente RMFLFOP y número de lecturas por millón (RPM).

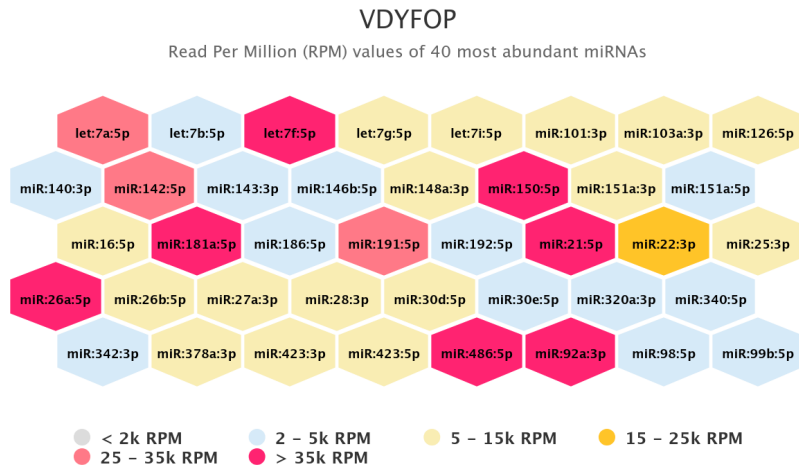


Figura 6. Mapa de mosaicos con los 40 miRNAs más abundantes en el paciente VDYFOP y número de lecturas por millón (RPM).

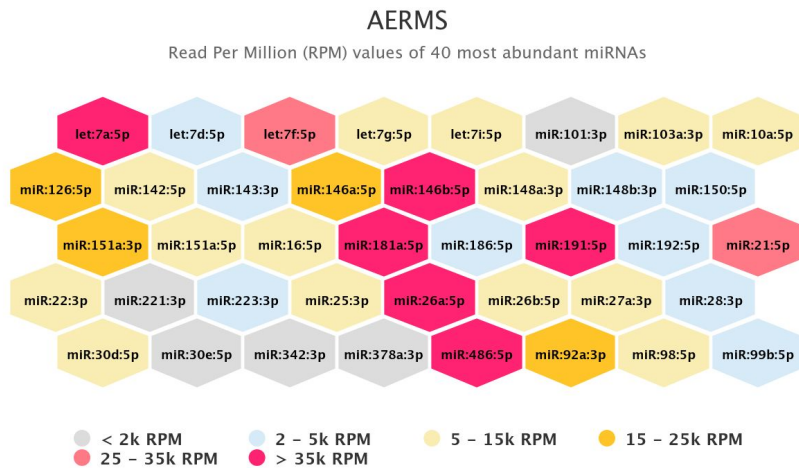


Figura 7. Mapa de mosaicos con los 40 miRNAs más abundantes en el control AERMS y número de lecturas por millón (RPM).

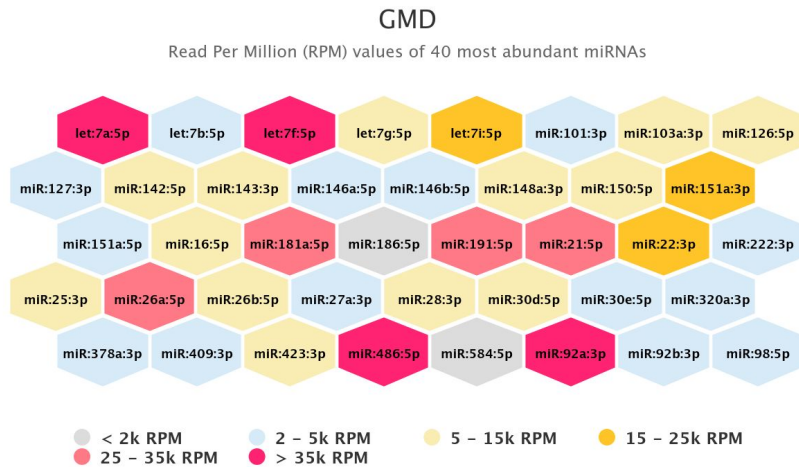


Figura 8. Mapa de mosaicos con los 40 miRNAs más abundantes en el control GMD y número de lecturas por millón (RPM).

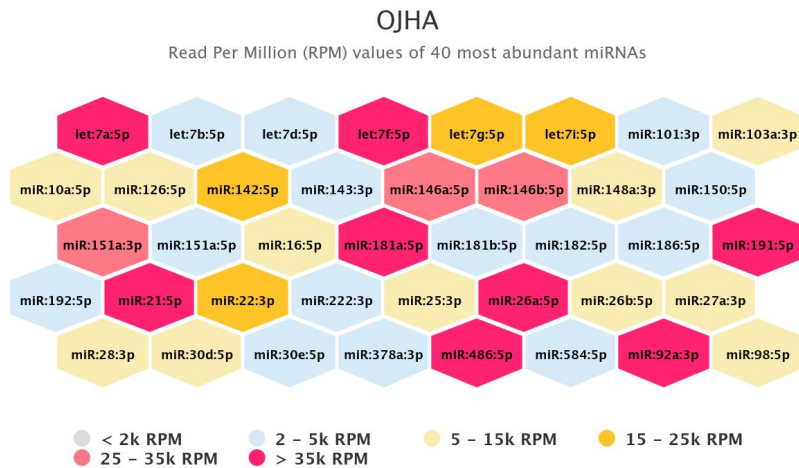


Figura 9. Mapa de mosaicos con los 40 miRNAs más abundantes en el control OJHA y número de lecturas por millón (RPM).

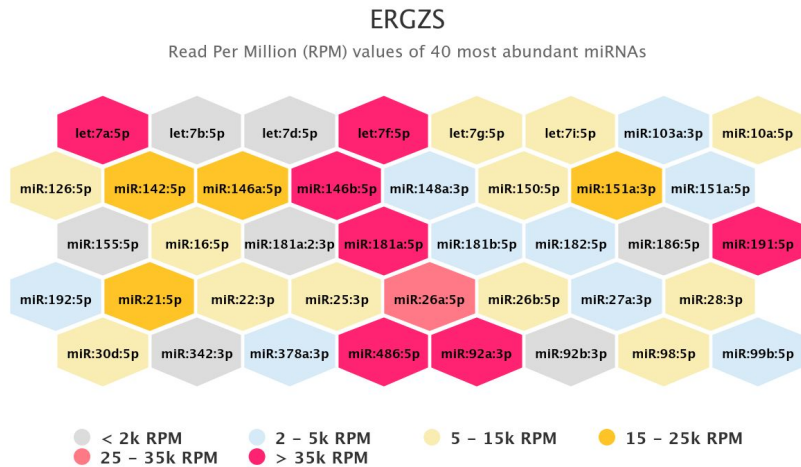


Figura 10. Mapa de mosaicos con los 40 miRNAs más abundantes en el control ERGZS y número de lecturas por millón (RPM).

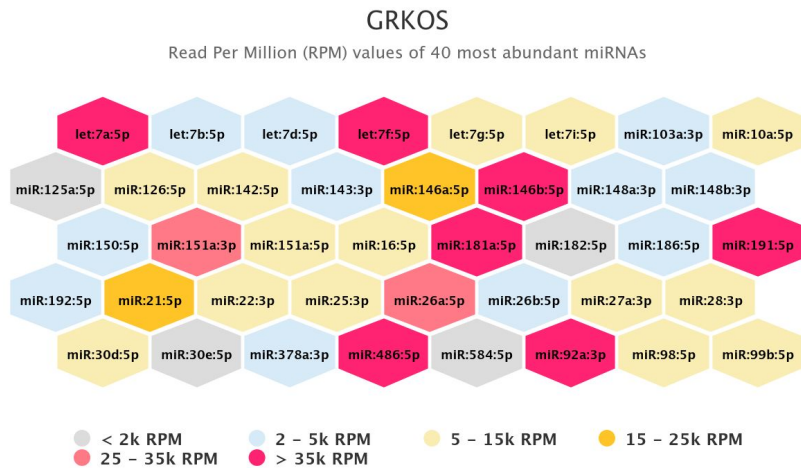


Figura 11. Mapa de mosaicos con los 40 miRNAs más abundantes en el control GRKOS y número de lecturas por millón (RPM).

miRNA	p.value	p.meaning
hsa-miR-1307-3p	0.0317	significativo
hsa-miR-1307-5p	0.0361	significativo
hsa-miR-15b-5p	0.0159	significativo
hsa-miR-199a-5p	0.0119	significativo
hsa-miR-22-3p	0.0317	significativo
hsa-miR-23a-3p/23b-3p	0.0079	significativo
hsa-miR-320a-3p/320b/320c/320d/320e	0.0159	significativo
hsa-miR-423-5p	0.0317	significativo
hsa-miR-484	0.0159	significativo
hsa-miR-532-5p	0.0212	significativo
hsa-miR-93-5p	0.0317	significativo
hsa-let-7a-3p	0.4237	no-sig
hsa-let-7a-5p/7c-5p	0.2222	no-sig
hsa-let-7b-3p	0.4237	no-sig
hsa-let-7b-5p	0.2222	no-sig
hsa-let-7d-3p	0.0556	no-sig
hsa-let-7d-5p	0.5476	no-sig
hsa-let-7e-5p	0.4633	no-sig
hsa-let-7f-5p	0.8413	no-sig
hsa-let-7g-5p	0.6905	no-sig
hsa-let-7i-3p	0.9063	no-sig
hsa-let-7i-5p	0.3095	no-sig
hsa-miR-100-5p	1	no-sig
hsa-miR-101-3p	0.0952	no-sig
hsa-miR-10395-3p	0.7972	no-sig
hsa-miR-10399-3p	0.6072	no-sig
hsa-miR-10399-5p	0.7241	no-sig
hsa-miR-103a-3p/107	0.0556	no-sig

hsa-miR-10527-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-106a-5p/17-5p	0.1732	no-sig
hsa-miR-106b-3p	0.0952	no-sig
hsa-miR-106b-5p	0.2903	no-sig
hsa-miR-10a-5p	0.1508	no-sig
hsa-miR-10b-5p	0.1732	no-sig
hsa-miR-11400	0.2903	no-sig
hsa-miR-1185-1-3p/1185-2-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-12136	0.1797	no-sig
hsa-miR-122-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-1249-3p	0.1797	no-sig
hsa-miR-125a-5p	0.4206	no-sig
hsa-miR-125b-5p	0.072	no-sig
hsa-miR-126-3p	0.0952	no-sig
hsa-miR-126-5p	0.8413	no-sig
hsa-miR-1260a/1260b	1	no-sig
hsa-miR-1262	0.4237	no-sig
hsa-miR-127-3p	1	no-sig
hsa-miR-1270-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-1271-5p	0.5038	no-sig
hsa-miR-1273h-3p	0.1508	no-sig
hsa-miR-1273h-5p	1	no-sig
hsa-miR-1275	0.9063	no-sig
hsa-miR-1277-5p	1	no-sig
hsa-miR-128-1-5p	0.9063	no-sig
hsa-miR-128-3p	0.3095	no-sig
hsa-miR-1285-3p	0.072	no-sig
hsa-miR-1294-5p	0.1797	no-sig
hsa-miR-1298-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-1299	1	no-sig

hsa-miR-1301-3p	0.6723	no-sig
hsa-miR-1303-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-1306-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-130a-3p	0.8413	no-sig
hsa-miR-130b-3p	0.2045	no-sig
hsa-miR-130b-5p	0.7533	no-sig
hsa-miR-132-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-133a-3p/133b	0.1797	no-sig
hsa-miR-134-5p	0.6558	no-sig
hsa-miR-136-3p	1	no-sig
hsa-miR-139-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-139-5p	0.1579	no-sig
hsa-miR-140-3p	0.0556	no-sig
hsa-miR-140-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-141-3p	0.8294	no-sig
hsa-miR-142-3p	0.1508	no-sig
hsa-miR-142-5p	0.3095	no-sig
hsa-miR-143-3p	0.0952	no-sig
hsa-miR-144-3p	0.7241	no-sig
hsa-miR-144-5p	0.4633	no-sig
hsa-miR-145-3p	0.1797	no-sig
hsa-miR-145-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-1468-5p	1	no-sig
hsa-miR-146a-5p	0.0952	no-sig
hsa-miR-146b-3p	0.6905	no-sig
hsa-miR-146b-5p	0.0556	no-sig
hsa-miR-148a-3p	0.1508	no-sig
hsa-miR-148a-5p	0.1161	no-sig
hsa-miR-148b-3p	0.4802	no-sig
hsa-miR-148b-5p	0.3886	no-sig

hsa-miR-150-3p	0.0952	no-sig
hsa-miR-150-5p	0.3095	no-sig
hsa-miR-151a-3p	0.6905	no-sig
hsa-miR-151a-5p/151b	0.5476	no-sig
hsa-miR-152-3p	1	no-sig
hsa-miR-152-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-1537-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-1538	0.4237	no-sig
hsa-miR-155-5p	0.4206	no-sig
hsa-miR-15a-5p	0.0556	no-sig
hsa-miR-15b-3p	0.7241	no-sig
hsa-miR-16-2-3p	0.0952	no-sig
hsa-miR-16-5p	0.4206	no-sig
hsa-miR-17-3p	0.1188	no-sig
hsa-miR-181a-2-3p	0.6905	no-sig
hsa-miR-181a-3p	0.4206	no-sig
hsa-miR-181a-5p	0.6905	no-sig
hsa-miR-181b-5p	0.3095	no-sig
hsa-miR-181c-3p	0.1732	no-sig
hsa-miR-181c-5p	0.6905	no-sig
hsa-miR-181d-5p	0.5179	no-sig
hsa-miR-182-5p	0.8413	no-sig
hsa-miR-183-5p	0.1797	no-sig
hsa-miR-1843	0.5258	no-sig
hsa-miR-185-3p	0.7972	no-sig
hsa-miR-185-5p	0.0952	no-sig
hsa-miR-186-5p	0.6905	no-sig
hsa-miR-18a-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-18a-5p	1	no-sig
hsa-miR-1908-5p	0.7972	no-sig

hsa-miR-190b-5p	0.4407	no-sig
hsa-miR-191-3p	0.1579	no-sig
hsa-miR-191-5p	0.1508	no-sig
hsa-miR-192-5p/215-5p	1	no-sig
hsa-miR-193a-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-193a-5p	0.7972	no-sig
hsa-miR-194-5p	0.5038	no-sig
hsa-miR-195-5p	1	no-sig
hsa-miR-196b-5p	1	no-sig
hsa-miR-197-3p	0.1508	no-sig
hsa-miR-1976	0.4237	no-sig
hsa-miR-199a-3p/199b-3p	0.0556	no-sig
hsa-miR-199b-5p	0.0746	no-sig
hsa-miR-19a-3p	0.2652	no-sig
hsa-miR-19b-3p	0.5476	no-sig
hsa-miR-200c-3p	0.1797	no-sig
hsa-miR-204-5p	0.6072	no-sig
hsa-miR-20a-5p	0.3095	no-sig
hsa-miR-20b-5p	0.6558	no-sig
hsa-miR-21-3p	0.0556	no-sig
hsa-miR-21-5p	0.2222	no-sig
hsa-miR-210-3p	0.072	no-sig
hsa-miR-2110	1	no-sig
hsa-miR-219a-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-22-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-221-3p	0.0556	no-sig
hsa-miR-221-5p	0.6664	no-sig
hsa-miR-222-3p	0.4206	no-sig
hsa-miR-222-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-223-3p	0.6905	no-sig

hsa-miR-223-5p	1	no-sig
hsa-miR-224-5p	0.1612	no-sig
hsa-miR-2355-3p	0.1797	no-sig
hsa-miR-2355-5p	1	no-sig
hsa-miR-23a-5p	0.072	no-sig
hsa-miR-24-2-5p	0.1797	no-sig
hsa-miR-24-3p	0.7533	no-sig
hsa-miR-2467-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-25-3p	0.4206	no-sig
hsa-miR-25-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-26a-2-3p	0.1797	no-sig
hsa-miR-26a-5p	0.6905	no-sig
hsa-miR-26b-3p	0.1612	no-sig
hsa-miR-26b-5p	0.3095	no-sig
hsa-miR-27a-3p/27b-3p	0.1508	no-sig
hsa-miR-27a-5p	0.3886	no-sig
hsa-miR-27b-5p	0.7241	no-sig
hsa-miR-28-3p	0.1508	no-sig
hsa-miR-28-5p	0.5476	no-sig
hsa-miR-29a-3p	0.4633	no-sig
hsa-miR-29a-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-29b-3p	0.2652	no-sig
hsa-miR-29c-3p	0.3886	no-sig
hsa-miR-29c-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-301a-3p	0.3095	no-sig
hsa-miR-301b-3p	0.0746	no-sig
hsa-miR-30a-3p	0.1797	no-sig
hsa-miR-30a-5p	0.0952	no-sig
hsa-miR-30b-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-30b-5p/30c-5p	0.3095	no-sig

hsa-miR-30c-1-3p	1	no-sig
hsa-miR-30d-3p	0.1388	no-sig
hsa-miR-30d-5p	0.1508	no-sig
hsa-miR-30e-3p	0.2222	no-sig
hsa-miR-30e-5p	0.1508	no-sig
hsa-miR-31-5p	1	no-sig
hsa-miR-3120-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-3127-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-3130-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-3150a-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-3158-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-3176-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-3177-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-32-5p	0.4506	no-sig
hsa-miR-323b-3p	0.1797	no-sig
hsa-miR-324-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-324-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-328-3p	0.057	no-sig
hsa-miR-330-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-330-5p	1	no-sig
hsa-miR-331-3p	0.1797	no-sig
hsa-miR-335-3p	0.6905	no-sig
hsa-miR-335-5p	0.0907	no-sig
hsa-miR-338-3p	0.8237	no-sig
hsa-miR-338-5p	0.4407	no-sig
hsa-miR-339-3p	0.1612	no-sig
hsa-miR-339-5p	0.067	no-sig
hsa-miR-33a-5p	0.1797	no-sig
hsa-miR-33b-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-33b-5p	1	no-sig

hsa-miR-340-3p	0.8325	no-sig
hsa-miR-340-5p	0.0952	no-sig
hsa-miR-342-3p	0.6905	no-sig
hsa-miR-342-5p	0.8325	no-sig
hsa-miR-345-5p	0.2045	no-sig
hsa-miR-34c-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-3605-3p	0.6072	no-sig
hsa-miR-361-3p	0.4206	no-sig
hsa-miR-361-5p	1	no-sig
hsa-miR-3613-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-3613-5p	0.4407	no-sig
hsa-miR-3614-5p	0.4407	no-sig
hsa-miR-3615-3p	0.3095	no-sig
hsa-miR-362-5p	0.7241	no-sig
hsa-miR-363-3p	1	no-sig
hsa-miR-3651	0.4237	no-sig
hsa-miR-369-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-369-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-3690	1	no-sig
hsa-miR-371b-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-374a-3p	0.6004	no-sig
hsa-miR-374a-5p	1	no-sig
hsa-miR-374b-3p	0.4407	no-sig
hsa-miR-374b-5p	0.7533	no-sig
hsa-miR-375-3p	0.1797	no-sig
hsa-miR-377-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-378a-3p/378c/378d/378e	0.1508	no-sig
hsa-miR-379-5p	1	no-sig
hsa-miR-381-3p	0.5258	no-sig
hsa-miR-382-5p	1	no-sig

hsa-miR-3913-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-409-3p	0.6905	no-sig
hsa-miR-409-5p	0.7972	no-sig
hsa-miR-410-3p	0.1508	no-sig
hsa-miR-411-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-411-5p	1	no-sig
hsa-miR-412-5p	0.7972	no-sig
hsa-miR-421	0.834	no-sig
hsa-miR-423-3p	0.0952	no-sig
hsa-miR-424-3p	0.4407	no-sig
hsa-miR-424-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-425-3p	1	no-sig
hsa-miR-425-5p	0.2222	no-sig
hsa-miR-4286	0.1579	no-sig
hsa-miR-431-5p	0.0556	no-sig
hsa-miR-432-5p	0.1612	no-sig
hsa-miR-433-3p	1	no-sig
hsa-miR-4433b-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-4433b-5p	0.0556	no-sig
hsa-miR-4435-5p	0.6072	no-sig
hsa-miR-4446-3p	0.3321	no-sig
hsa-miR-4454	0.4237	no-sig
hsa-miR-4473-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-4508	0.4237	no-sig
hsa-miR-450a-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-450b-5p	0.1797	no-sig
hsa-miR-451a	0.8413	no-sig
hsa-miR-452-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-454-3p	0.6664	no-sig
hsa-miR-454-5p	0.1812	no-sig

hsa-miR-4645-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-4662a-5p	0.3727	no-sig
hsa-miR-4677-3p	1	no-sig
hsa-miR-4687-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-4746-5p	0.7972	no-sig
hsa-miR-4786-5p	0.1797	no-sig
hsa-miR-485-3p	1	no-sig
hsa-miR-486-3p	0.5038	no-sig
hsa-miR-486-5p	0.0556	no-sig
hsa-miR-487b-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-493-3p	0.4407	no-sig
hsa-miR-493-5p	1	no-sig
hsa-miR-494-3p	1	no-sig
hsa-miR-497-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-500a-3p/502-3p	0.0593	no-sig
hsa-miR-501-3p	0.4206	no-sig
hsa-miR-505-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-508-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-509-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-5189-5p	0.1797	no-sig
hsa-miR-532-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-539-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-542-3p	1	no-sig
hsa-miR-548a-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-548ab/548n	0.4237	no-sig
hsa-miR-548am-5p/548au-5p/548c-5p/548o-5p	1	no-sig
hsa-miR-548av-5p/548k	0.3321	no-sig
hsa-miR-548bc	0.4237	no-sig
hsa-miR-548e-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-548e-5p	0.4237	no-sig

hsa-miR-550a-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-556-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-5701	0.4237	no-sig
hsa-miR-574-3p	0.7972	no-sig
hsa-miR-574-5p	0.6072	no-sig
hsa-miR-576-5p	0.6072	no-sig
hsa-miR-577-5p	0.6072	no-sig
hsa-miR-582-3p	0.4407	no-sig
hsa-miR-582-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-584-5p	0.3095	no-sig
hsa-miR-589-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-589-5p	0.4206	no-sig
hsa-miR-590-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-598-3p	1	no-sig
hsa-miR-616-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-625-3p	0.5038	no-sig
hsa-miR-625-5p	0.2393	no-sig
hsa-miR-627-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-628-3p	1	no-sig
hsa-miR-628-5p	0.1797	no-sig
hsa-miR-629-5p	0.8237	no-sig
hsa-miR-641	0.4237	no-sig
hsa-miR-6502-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-6503-3p	0.1797	no-sig
hsa-miR-651-5p	1	no-sig
hsa-miR-652-3p	0.1161	no-sig
hsa-miR-652-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-654-3p	0.8413	no-sig
hsa-miR-654-5p	0.1797	no-sig
hsa-miR-659-5p	0.7972	no-sig

hsa-miR-660-5p	0.5476	no-sig
hsa-miR-664a-3p	0.6072	no-sig
hsa-miR-664a-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-668-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-671-3p	0.8413	no-sig
hsa-miR-6721-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-6741-3p	1	no-sig
hsa-miR-6774-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-6813-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-6837-3p	0.3465	no-sig
hsa-miR-6842-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-6852-5p	1	no-sig
hsa-miR-6866-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-7-1-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-7-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-744-5p	0.3095	no-sig
hsa-miR-766-3p	0.7533	no-sig
hsa-miR-766-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-769-5p	0.4206	no-sig
hsa-miR-7702-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-7704	0.9142	no-sig
hsa-miR-7705	1	no-sig
hsa-miR-7706	0.4633	no-sig
hsa-miR-7848-3p	0.7972	no-sig
hsa-miR-7849-3p	0.2393	no-sig
hsa-miR-7854-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-7855-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-7974	0.4237	no-sig
hsa-miR-7976	1	no-sig
hsa-miR-873-5p	0.7241	no-sig

hsa-miR-874-3p	0.4802	no-sig
hsa-miR-877-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-889-3p	1	no-sig
hsa-miR-9-5p	0.4407	no-sig
hsa-miR-92a-3p	0.3095	no-sig
hsa-miR-92b-3p	0.8413	no-sig
hsa-miR-92b-5p	0.4237	no-sig
hsa-miR-93-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-941	1	no-sig
hsa-miR-942-5p	0.1797	no-sig
hsa-miR-95-3p	0.4237	no-sig
hsa-miR-98-5p	0.2222	no-sig
hsa-miR-99a-5p	0.7972	no-sig
hsa-miR-99b-5p	0.5476	no-sig

Tabla 1. Total de miRNAs expresados diferencialmente en PBMC de pacientes con FOP en comparación con controles sanos pareados por edad y sexo.