



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

María José
Currás Tuala

Tesis doctoral

Estudio integral clínico, celular y
ómico-molecular de un caso único
de gemelas idénticas discordantes
para heteroplasia ósea progresiva

Santiago de Compostela, 2022



TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO INTEGRAL CLÍNICO,
CELULAR Y ÓMICO-MOLECULAR DE
UN CASO ÚNICO DE GEMELAS
IDÉNTICAS DISCORDANTES PARA
HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA**

María José Currás Tuala

**ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

ESTUDIO INTEGRAL CLÍNICO, CELULAR Y ÓMICO-MOLECULAR DE UN CASO ÚNICO DE GEMELAS IDÉNTICAS DISCORDANTES PARA HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA

Dña. **María José Currás Tuala**,

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

Santiago de Compostela, 2 de mayo de 2022

Fdo. María José Currás Tuala



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

ESTUDIO INTEGRAL CLÍNICO, CELULAR Y ÓMICO-MOLECULAR DE UN CASO ÚNICO DE GEMELAS IDÉNTICAS DISCORDANTES PARA HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA

D. Federico Martínón Torres

D. Antonio Salas Ellacuriaga

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D^a. **María José Currás Tuala**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en la modalidad de **Monográfica con reproducción de publicaciones**, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al plan de investigación.

En Santiago de Compostela, a 26 de septiembre de 2022.

Fdo. D. Federico Martínón Torres

Fdo. D. Antonio Salas Ellacuriaga

Parte de esta tesis se realizó gracias a los donativos realizados por la Asociación Gallega de Heteroplasia Ósea Progresiva (ASGPOH) al grupo de Investigación Genética, Vacunas e Infecciones en Pediatría (GENVIP) -C020 del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

La doctoranda **declara no tener ningún conflicto de interés en relación con esta tesis doctoral.** Todas las figuras mostradas en este trabajo son de **autoría propia excepto en las que se indique lo contrario.**

Santiago de Compostela, 2 de mayo de 2022

Doctoranda: **María José Currás Tuala**

RESUMEN

La Heteroplasia Ósea Progresiva (HOP) es una enfermedad genética ultra rara autosómica dominante que produce formación de hueso extraesquelético a partir de tejido mesodérmico como son piel y músculo. La alteración genética característica de HOP es una mutación heterocigota inactivante localizada en el complejo *GNAS*, uno de los más complicados del cuerpo humano. El gen codifica para la proteína *G-stimulatory protein of adenyl cyclase* (G α). No existe ningún tratamiento efectivo ni preventivo para esta enfermedad y la alternativa para mejorar la calidad de vida pasa por la amputación quirúrgica de los miembros afectados y escisión de las lesiones bien delimitadas.

Este trabajo presenta el único caso reportado en el mundo de HOP en dos gemelas univitelinas idénticas, que presentan la misma mutación *de novo* en heterocigosis en el gen *GNAS*, exón 7 con delección en 4 pares de bases (pb) (GACT; *GNAS1* n565-568; 20q13); sin embargo, mientras una de ellas permanece asintomática, la otra sufre una forma inusualmente rápida e incapacitante de la enfermedad desde su infancia.

El objetivo general de este trabajo se centra en la caracterización de la enfermedad mediante un abordaje “-ómico” traslacional, inmunológico y celular y la evaluación de terapias farmacológicas. Los avances que aporte este trabajo podrían ampliar el entendimiento de la enfermedad y de patologías relacionadas con mutaciones en *GNAS* (Distrofia Hereditaria de Albright, pseudohipoparatiroidismo, osteoma primario de cutis, etc.).

*“No estudio para saber más,
sino para ignorar menos”*

Sor Juana Inés de la Cruz

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de una tesis doctoral es sin duda un periodo de situaciones que nos lleva al límite en muchos sentidos, éste trabajo me ha representado uno de los mayores retos a nivel personal y profesional y que gracias al apoyo, implicación y cooperación de un montón de personas ha sido posible. Por ello externo mi gratitud a todos los que han dejado huella en este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores Federico Martín Torres y Antonio Salas Ellacuriaga; además a José Gómez Rial, quienes me han brindado su apoyo y soporte a lo largo de todos estos años, tanto profesional como personalmente, además de darme la oportunidad de ser parte del gran grupo GENVIP.

Por otro lado, mi agradecimiento a los diferentes servicios del CHUS que han apoyado, aportado y seguido de cerca, tanto el caso clínico, como la investigación A todo el servicio de Pediatría; Cirugía Pediátrica, en especial al Dr. Roberto Gómez Gallart y al Dr. Alberto Jorge Mora; Neonatología, en especial a la Dra. María José Fernández Seara; Endocrinología; Gastroenterología; Neurología; Dermatología; Unidad de Pacientes Crónicos; Traumatología; Rehabilitación y Fisioterapia; Farmacia, en especial a José María Giraldez Montero; al servicio de Anatomía Patológica, en especial al Dr. José Ramón Antúnez López y el Dr. Máximo Francisco Fraga Rodríguez.

Ha sido un gran trabajo en equipo y por ello, quiero agradecer a todas las personas que de alguna manera han contribuido en el desarrollo de este gran reto.

Gracias a todo el grupo GENVIP, al equipo médico, en especial a la Dra. Irene Rivero Calle, al Dr. Antonio José Justicia Grande por su dedicación y empeño en el seguimiento clínico de las gemelas, lo que hizo posible gran parte de este trabajo, al Dr. Lorenzo Redondo y a todo el equipo de enfermería: Sonia, Sara, MariSol, Ana y Rita. A todo el equipo administrativo del grupo, a Antonio, Carlos, Esther, Sandra, en especial a Belén Mosquera por tu implicación, incansable apoyo y gran amistad.

Gracias a mis AMIGOS y familia gallega por su apoyo, implicación y amistad que, a lo largo de estos 7 años de trabajo, juntos me ha dejado un gran aprendizaje y sin duda un soporte profesional y personal importante. Gracias Albert, Jacobeishon y Sara por las contribuciones en este trabajo, y por su mucha paciencia. Mirian, Patri y Lara por su gran ayuda y por tenerme a la mano siempre lo necesario para desarrollar los experimentos. Miriam, Sandra, Xabi, Isa, Juli, Laura por acompañarme y darme mucho ánimo grupal. Gracias a todos por su apoyo constante y por entrar en mis múltiples locuras.

Quiero extender mi agradecimiento a diferentes grupos y plataformas del IDIS quienes siempre estuvieron abiertos a la cooperación y apoyo, al laboratorio de Oncología; Nano-Oncología y Terapéutica Traslacional; al grupo Obesidómica; Células Madre en Cáncer y Envejecimiento; al laboratorio de Genética en Cáncer y enfermedades Raras; muy especialmente, mi gratitud a todo el grupo de Enfermedades Musculoesqueléticas, a Rodolfo Gómez Bahamonde, María, Ana, Miriam, Eloi, Vero, Andrés, por su colaboración, dedicación y apoyo incondicional en este trabajo. Gracias a la plataforma de Proteómica en especial a Susana Bravo, Plataforma de Microscopía confocal en especial a Marta Picado, a la plataforma de Detección Molecular Digital Directa (Nanostring) en especial a Alberto Gómez Carballa y a la plataforma de Epigenética en especial a Ana Crujeiras y Ángel Díaz.

Gracias a mi compañero de vida Miguel por llevarme siempre de la mano y no soltarme, por todo tu apoyo profesional y personal. A mi familia que desde el otro lado del “charco” me han transmitido su apoyo en este camino profesional. A mi hija Xanat por enseñarme la resiliencia y proveerme de luz cada día. A mis amigos mexicanos Olivia, Rocío, Sandra, Luis, Alberto, Sofía, Diego y Robert, por su compañía y apoyo.

Por último, el agradecimiento principal y más importante, a la Asociación Gallega de Heteroplasia Ósea Progresiva (ASGPOH), a la familia Suarez Agraso: Loló, Edu, Caye y Celia, no tengo las palabras suficientes ni exactas para extender mi admiración y agradecimiento por toda su confianza, el gran apoyo a la investigación y por permitirnos ser parte de sus vidas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AHO:	Distrofia hereditaria de Albright (por sus siglas en inglés: <i>Albright's hereditary osteodystrophy</i>)
AINES:	Antiinflamatorios no esteroideos
ALP:	Fosfatasa alcalina sérica (por sus siglas en inglés: <i>alkaline phosphatase</i>)
ALPL:	Gen de la Fosfatasa alcalina sérica (por sus siglas en inglés: <i>alkaline phosphatase, biomineralization associated</i>)
BMP:	Proteínas Morfogénicas de hueso (por sus siglas en inglés: <i>Bone morphogenetic proteins</i>)
BP:	Procesos biológicos (por sus siglas en inglés: <i>biological processes</i>)
BTM:	Marcadores de recambio óseo (por sus siglas en inglés: <i>bone turnover markers</i>)
CC:	Componentes celulares (por sus siglas en inglés: <i>cellular components</i>)
cDNA:	DNA complementario
CHUS:	Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela
CNV:	Variación en el número de copias, por sus siglas en inglés: <i>copy number variation</i>)
CPM:	Recuentos por millón (por sus siglas en inglés: <i>counts per million</i>)
CTX:	Telopéptido-C terminal tipo I o β -Crosslaps
DDA:	Adquisición dependiente de datos (por sus siglas en inglés: <i>data-dependent acquisition</i>)
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMP:	Posiciones diferencialmente metiladas (por sus siglas en inglés: <i>differentially methylated positions</i>)
DMR:	Regiones diferencialmente metiladas (por sus siglas en inglés: <i>differentially methylated regions</i>)
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DTT:	Ditiotreitol

Dx:	Dexametasona
ECM:	Matriz extracelular (por sus siglas en inglés: <i>extracellular matrix</i>)
EU:	Unión Europea (por sus siglas en inglés: <i>European Union</i>)
EWAS:	Estudio de asociación del epigenoma completo (por sus siglas en inglés: <i>epigenome-wide association study</i>)
Fb _{ady} :	Fibroblastos de piel adyacente a una osificación de la Paciente1
Fb _{ctrl} :	Fibroblastos de piel control
Fb _{sanos} :	Fibroblastos de piel sana de Paciente1
FBS:	Suero bobino fetal (por sus siglas en inglés: <i>fetal bovine serum</i>)
FDR:	Tasa de falsos descubrimientos (por sus siglas en inglés: <i>false discovery rate</i>)
FGF:	Factor de crecimiento fibroblástico (por sus siglas en inglés: <i>fibroblast growth factor</i>)
FOP:	Fibrodisplasia osificante progresiva (por sus siglas en inglés: <i>Fibrodysplasia ossificans progressiva</i>)
GH:	Hormona de crecimiento (por sus siglas en inglés: <i>growth hormone</i>)
GHRH:	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (por sus siglas en inglés: <i>growth hormone-releasing hormone</i>)
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (por sus siglas en inglés: <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GO:	Ontología génica (por sus siglas en inglés: <i>gene ontology</i>)
Gs- α :	Subunidad <i>alpha</i> de la proteína G
GPCrs	Receptores unidos a la proteína G (por sus siglas en inglés: <i>G-protein coupled receptors</i>)
Hh:	Hedgehog
HOP:	Heteroplasia ósea progresiva
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés: <i>high performance liquid chromatography</i>)
IBD:	Identidad por descendencia (por sus siglas en inglés: <i>identity-by-descent</i>)
ICH:	Conferencia internacional sobre armonización (por sus siglas en inglés: <i>International council for harmonisation</i>)
IDIS:	Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela
IGF-1:	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (por sus siglas en inglés: <i>insulin-like growth factor 1</i>)

IF:	Inmunofluorescencia
Indo:	Indometacina
LC-MS/MS:	cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (por sus siglas en inglés: <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>)
lnc-RNA:	ARN largo no codificante (por sus siglas en inglés: <i>Long non-coding RNAs</i>)
Log ₂ FC:	Logaritmo en base dos de la magnitud de cambio (por sus siglas en inglés: <i>logarithmic [base 2] fold changes</i>)
MC:	Funciones moleculares (por sus siglas en inglés: <i>molecular functions</i>)
MCP-1:	Citoquina quimioatrayente de monocitos 1 (por sus siglas en inglés: <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
Milli-Q:	Agua ultrapura, con grado de laboratorio filtrada y purificada por ósmosis inversa.
MS:	Espectrometría de masas (por sus siglas en inglés: <i>mass spectrometry</i>)
MSCs:	Células madre mesenquimales (por sus siglas en inglés: <i>Mesenchymal stem cells</i>)
mTOR:	Diana de rapamicina en células de mamífero (por sus siglas en inglés: <i>mammalian target of rapamycin</i>)
NGS:	Secuenciación de nueva generación, (por sus siglas en inglés: <i>next generation secuency</i>)
NICD:	Dominio intracelular de Notch (por sus siglas en inglés: <i>Notch intracellular domain</i>)
Ob _{Ctrl} :	Osteoblastos “like” de hueso control
Ob _{sano} :	Osteoblastos “like” de hueso sano de Paciente 1
Ob _{osif} :	Osteoblastos “like” osificación de Paciente 1
OC:	Osteocalcina
OH:	Osificación Heterotópica
OPG:	Osteoprotegerina
OPN:	Osteopontina
pb:	Pares de bases
ppm:	Partes por millón
PBS:	Buffer fosfato salino (por sus siglas en inglés: <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCA:	Análisis de componentes principales (por sus siglas en inglés: <i>principal component análisis</i>)

PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés: <i>polymerase chain reaction</i>)
PHP:	Pseudoparatiroidismo
PINP:	Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (por sus siglas en inglés: <i>amino-terminal propeptide of procollagen I</i>)
PPHP:	Pseudopseudo-hipoparatoriodismo
pre-Adp _{sano} :	Pre-adipocitos sanos de Paciente1
pre-Adp _{ady} :	Pre-adipocito adyacente a una osificación de Paciente1
PTH:	Hormona paratiroidea (por sus siglas en inglés: <i>parathyroid hormone</i>)
PTHrP:	Proteína relacionada con la hormona paratiroidea (por sus siglas en inglés: <i>parathyroid hormone-related protein</i>)
PWF:	Función de ponderación de la probabilidad (por sus siglas en inglés: <i>probability weighting function</i>)
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (por sus siglas en inglés: <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RANKL:	Ligando receptor activador nuclear kappa (por sus siglas en inglés: <i>Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand</i>)
RGPD:	Reglamento general de protección de datos
RIN:	Número de integridad del ARN (por sus siglas en inglés: <i>RNA integrity number</i>)
RIPA:	Ensayo de Radioinmunoprecipitación (por sus siglas en inglés: <i>radioimmunoprecipitation assay</i>)
Rosi:	Rosiglitazona
rpm:	Revoluciones por minuto
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (por sus siglas en inglés: <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
RT-qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (por sus siglas en inglés: <i>quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (por sus siglas en inglés: <i>sodium dodecyl sulfate polyAcrylamide gel electrophoresis</i>)
SNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés: <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SNV:	Variante de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés: <i>single nucleotide variant</i>)

SWATH-MS:	Adquisición de ventana secuencial de todos los espectros de iones de fragmentos teóricos (por sus siglas en inglés: <i>sequential window acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra</i>)
TGF- β :	Factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés: <i>transforming growth factor beta</i>)
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en inglés: <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TOF:	Tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés: <i>time of flight</i>)
TTM:	Media recordada ponderada de los valores M (por sus siglas en inglés: <i>Trimmed Mean of M-values</i>)
Tris HCl:	Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano
TTBS:	Tris HCl, al que se le agregó 0,1% de Tween-20
TSS:	Sitios de inicio de transcripción (por sus siglas en inglés: <i>Transcription start site</i>)
UTR:	Región no traducida de los genes (por sus siglas en inglés: <i>Unstranlated región</i>)
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular (por sus siglas en inglés: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
WB:	<i>Western blot</i>

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	37
1.1 HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA (HOP).....	39
1.1.1 Heteroplasia Ósea Progresiva, una enfermedad ultra rara.....	39
1.1.2 Clasificación de la HOP como enfermedad.....	40
1.1.2.1 Clasificación internacional de enfermedades CIE-10.....	40
1.1.2.2 Clasificación Orphanet.....	41
1.1.2.3 Otras clasificaciones	42
1.2 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA	43
1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA	46
1.3.1 GNAS en la Heteroplasia Ósea Progresiva	46
1.3.1.1 Imprinting genómico.....	46
1.3.1.2 Locus GNAS y sus transcritos	47
1.3.1.3 GNAS y la diferenciación celular	48
1.3.1.3.1 Rutas de señalización implicadas en diferenciación adipo-osteogénica	50
1.3.1.3.2 Ruta de señalización TGF- β /BMP	51
1.3.1.3.3 Ruta de señalización Wnt/ β catenina	52
1.3.1.3.4 Ruta de señalización Hedgehog.....	53
1.3.1.3.5 Ruta de señalización mTOR.....	53
1.3.1.3.6 Ruta de señalización Notch.....	54
1.3.2 Osificaciones heterotópicas.....	55
1.3.2.1 Formación y tipos de OH.....	56
1.3.2.2 Formación de osificación intramembranosa.....	56
1.3.2.3 Formación de osificación endocondral	56
1.3.2.4 Factores asociados a la formación de OH	57
1.3.2.5 Interacción osteo-inmune en la formación de OH.....	58
1.4 TRATAMIENTOS	58
1.5 PROGRESIÓN Y PRONÓSTICO DE HOP	59
1.6 BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES	59
1.6.1 Epigenética.....	59
1.6.2 Transcriptómica	60
1.6.3 Proteómica	60
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	61
3. MATERIAL Y MÉTODOS	65
3.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS	67
3.2 SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LAS PACIENTES CON HOP	67
3.2.1 Diagnóstico genético para HOP	67
3.2.2 Evaluación analítica de la progresión de la enfermedad	68
3.2.3 Análisis de marcadores de osteoinmunidad mediante ELISA multiplex	68
3.2.4 Diseño del protocolo farmacológico	69
3.2.5 Evaluación del efecto del protocolo farmacológico sobre la enfermedad.....	71

3.2.6 Evaluación del Everolimus como tratamiento para HOP	71
3.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LOS ESTUDIOS ÓMICOS Y CELULARES	71
3.4 ANÁLISIS EPIGENÉTICOS DE HOP A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA	72
3.4.1 Extracción y cuantificación de ADN	72
3.4.2 Estudio de asociación del epigenoma completo	72
3.4.3 Análisis de datos EWAS.....	73
3.5 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICOS DE HOP MEDIANTE TECNOLOGÍA N- COUNTER	73
3.5.1 Preparación de muestras para su análisis con n-Counter	74
3.5.2 Hibridación y lectura en n-Counter	75
3.5.3 Normalización y análisis de datos en n-Counter	75
3.5.4 Experimento de miARN en n-Counter	76
3.5.5 Análisis de interacciones de genes dianas de miARN	77
3.5.6 Análisis de enriquecimiento	78
3.6 ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO EXPLORATORIO EN HOP CON TECNOLOGÍA RNASEQ.....	78
3.6.1 Extracción de ARN.....	78
3.6.2 Secuenciación RNAseq	78
3.6.3 Análisis de datos	79
3.7 PROTEÓMICA DIFERENCIAL DE SUEROS DE PACIENTES HOP Y CONTROLES	80
3.7.1 Depleción y alquilación de proteínas abundantes de sueros	80
3.7.2 Digestión proteica.....	80
3.7.3 Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC/MS-MS).....	81
3.7.4 Análisis de datos proteómicos	81
3.7.5 Cuantificación de proteínas mediante análisis SWATH-MS	82
3.7.5.1 Creación de librerías de proteínas	82
3.7.5.2 Cuantificación relativa por adquisición SWATH-MS	82
3.7.6 Análisis estadístico en proteómica.....	83
3.8 GENERALIDADES DE LOS CULTIVOS CELULARES	83
3.8.1 Subcultivo celular.....	84
3.8.2 Conteo celular.....	84
3.8.3 Viabilidad celular	84
3.8.4 Criopreservación celular.....	85
3.8.5 Descongelación.....	85
3.9 CULTIVOS PRIMARIOS	85
3.9.1 Aislamiento y cultivo primario de osteoblastos “like”	85
3.9.2 Aislamiento y cultivo primario de fibroblastos	86
3.9.2.1 Aislamiento de Fibroblastos por método de explante	86

3.9.2.2 Aislamiento de Fibroblastos por método de explante	87
3.9.3 Aislamiento y cultivo primario de pre-adipocitos	88
3.10 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR.....	88
3.10.1 Extracción y cuantificación de ARN.....	88
3.10.2 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)	89
3.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) con <i>SYBR Green</i>	89
3.10.4 Análisis de los datos obtenidos de la RT-qPCR.....	89
3.11 CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN OSTEÓBLASTOS “ <i>LIKE</i> ”	90
3.12 DETECCIÓN DE ISOFORMAS DE <i>GNAS</i> MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i>	91
3.12.1 Extracción de proteínas	91
3.12.2 Cuantificación de proteínas por método de Bradford.....	91
3.12.3 Separación de proteínas por electroforesis SDS-PAGE.....	92
3.12.4 Transferencia y bloqueo	92
3.12.5 Inmunodetección	93
3.13 LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA GS- α MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.....	93
3.13.1 Cultivo celular para inmunofluorescencia.....	93
3.13.2 Fijación y permeabilización	94
3.13.3 Inmunomarcaje.....	94
3.13.4 Análisis de imágenes	94
3.14 PRUEBA DE FÁRMACOS EN CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS.....	94
3.14.1 Determinación de dosis de fármacos.....	94
3.14.2 Efecto de fármacos en la diferenciación celular.....	95
3.15 EFECTOS DEL SUERO DE LAS PACIENTES EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR	96
4. RESULTADOS.....	97
4.1 CAPÍTULO 1. PRESENTACIÓN DEL CASO ÚNICO DE GEMELAS IDÉNTICAS DISCORDANTES CON DIAGNÓSTICO DE HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA	99
4.1.1 Antecedentes personales y familiares. primeros signos clínicos de las gemelas.....	99
4.1.2 Diagnóstico genético	99
4.1.3 Progresión de la enfermedad	100
4.1.4 Interacción del sistema inmunitario y el metabolismo óseo (osteoinmunidad) en la HOP.....	104
4.1.5 Protocolo de tratamiento farmacológico	105
4.1.5.1 Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con rhIGF-1.....	107
4.1.5.2 Evaluación de la Paciente1 durante el Tratamiento con retinoides	107
4.1.5.3 Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con bifosfonatos	107

4.1.5.4	Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con corticoides	108
4.1.5.6	Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con Everolimus.....	110
4.1.5.6.1	<i>Monitorización de marcadores óseos durante el tratamiento con Everolimus</i>	112
4.1.5.7	Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con una triterapia (pioglitazona/indometacina/dexametasona).....	114
4.1.6	Procedimientos quirúrgicos	114
4.2	CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DEL EPIGENOMA DE LAS PACIENTES CON HOP	115
4.2.1	Comparación del perfil de metilación entre pacientes HOP y controles	115
4.2.2.1	Análisis de enriquecimiento en términos de ontología génica (GO) de la comparación del perfil de metilación entre las pacientes HOP y controles	119
4.2.2	Comparación del perfil de metilación entre pacientes HOP	120
4.3	CAPÍTULO 3. PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DIFERENCIAL ENTRE TEJIDOS DE PACIENTE CON HOP Y TEJIDOS CONTROL; Y DE SANGRE PERIFÉRICA ENTRE LA PACIENTE1 Y LA PACIENTE2	124
4.3.1	Comparación de patrones de expresión génica de muestras de osificación de la Paciente1 con tejido óseo normal de paciente control sano.....	124
4.3.2	Patrones de expresión génica en la piel de la Paciente1 comparado con la piel del paciente control.....	128
4.3.3	Perfil de miARN en muestra de sangre de las pacientes con HOP.....	130
4.3.4	Estudio comparativo exploratorio de transcriptoma completo mediante RNAseq de muestras de sangre de la Paciente1 y la Paciente2	132
4.4	CAPÍTULO 4. ANÁLISIS PROTEÓMICOS EN SUEROS DE LAS PACIENTES CON HOP	136
4.4.1	Análisis cualitativo	136
4.4.1.1	Categorización de las proteínas en términos de ontología génica.....	137
4.4.1.1.1	<i>Análisis GO en grupo HOP</i>	137
4.4.1.1.2	<i>Análisis GO en grupo control</i>	139
4.4.1.1.3	<i>Análisis GO entre pacientes HOP</i>	139
4.4.1.2	Proteínas presentes en el grupo control y ausentes en grupo HOP	142
4.4.1.3	Proteínas presentes en el grupo HOP y ausentes en grupo control	142
4.4.2	Análisis cuantitativo	143
4.4.2.1	Identificación de Proteínas Séricas Diferencialmente Expresadas en Pacientes con HOP frente al grupo Control.....	144
4.4.2.1.1	<i>Análisis de sobre-representación de proteínas en el grupo HOP frente al grupo Control</i>	145
4.4.2.2	Identificación de Proteínas Séricas Diferencialmente Expresadas en la Paciente1 frente al Grupo Control.....	147
4.4.2.2.1	<i>Análisis de sobrerepresentación de proteínas en Paciente1 frente grupo Control</i>	149
4.4.2.3	Identificación de Proteínas Séricas Diferencialmente Expresadas en la Paciente2 frente al Grupo Control.....	151
4.4.2.3.1	<i>Análisis de sobrerepresentación de proteínas en Paciente2 frente grupo Control</i>	152
4.4.2.4	Identificación de Proteínas Séricas Diferencialmente Expresadas en la Paciente1 frente a la Paciente2.....	154

4.4.2.4.1 <i>Análisis de sobrerrepresentación de proteínas en Paciente1 frente a Paciente2</i>	155
4.5 CAPÍTULO 5. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> EN EL ENTORNO DE LA HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA	158
4.5.1 Establecimiento de cultivos celulares primarios	158
4.5.2 Detección de la proteína Gs- α en cultivos primarios	159
4.5.3 Localización de la proteína Gs- α en cultivos primarios mediante inmunofluorescencia	160
4.5.4 Caracterización de los osteoblastos “ <i>like</i> ” primarios durante la diferenciación.....	162
4.5.5 Ensayos farmacológicos en cultivos primarios de paciente con HOP.....	165
4.5.5.1 Determinación de dosis farmacológicas experimentales en osteoblastos “ <i>like</i> ” de cultivo primario	165
4.5.5.2 Efecto farmacológico en osteoblastos “ <i>like</i> ” durante la diferenciación osteogénica	167
4.5.5.3 Niveles de expresión de marcadores osteogénicos durante el proceso de diferenciación en respuesta al tratamiento.....	167
4.5.5.3.1 <i>Efecto de Everolimus durante la diferenciación osteogénica</i>	168
4.5.5.3.2 <i>Efecto de Vismodegib durante la diferenciación osteogénica</i>	168
4.5.5.3.3 <i>Efecto de Esclerostina durante la diferenciación osteogénica</i>	168
4.5.5.3.4 <i>Efecto de una Triterapia (Rosiglitazona, Dexametasona e Indometacina) durante la diferenciación osteogénica</i>	169
4.5.6 Ensayos funcionales del uso de sueros de pacientes con HOP y controles durante la diferenciación celular	171
5. DISCUSIÓN.....	173
6. CONCLUSIONES	189
7. BIBLIOGRAFÍA.....	193
8. ANEXOS.....	221
ANEXO 1. DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO (2019/325).....	223
ANEXO 2. ARTÍCULO RELACIONADO CON ESTA TESIS	225
ANEXO 3. MARCADORES DE OSTEOINMUNIDAD EN SUERO DE PACIENTES CON HOP VS CONTROLES	237
ANEXO 4. MEDICIÓN DE MARCADORES SÉRICOS RELACIONADOS CON EL METABOLISMO ÓSEO EN LA PACIENTE1 VS PACIENTE2.....	239
ANEXO 5. CORRELACIÓN ENTRE PARÁMETROS ANALÍTICOS Y LOS NIVELES DE EVEROLIMUS EN SANGRE DE LA PACIENTE1	241
ANEXO 6. POSICIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS DE LA PACIENTE1 COMPARADA CON LA PACIENTE2.....	243
ANEXO 7. ANOTACIONES DE LAS TRES POSICIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS SIGNIFICATIVAS DEL GEN GNAS	245

ANEXO 8.	CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES LOG ₂ FC DE LOS GENES SOBRE- E INFRA-EXPRESADOS ENTRE LAS OSCIFICACIONES (ABDOMINAL Y ESCAPULAR) DE LA PACIENTE1	247
ANEXO 9.	ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GENES INFRA- Y SOBRE-EXPRESADOS DE MUESTRAS DE OSIFICACIÓN DE LA PACIENTE1 COMPARADO CON TEJIDO ÓSEO NORMAL DE PACIENTE CONTROL SANO	249
ANEXO 10.	CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES LOG ₂ FC DE LOS GENES EN LA PIEL (ZONA RODILLA Y GLÚTEO) DE LA PACIENTE1	251
ANEXO 11.	ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO EN TÉRMINOS GO EN GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE PIEL DE LA RODILLA DE LA PACIENTE1 VS PIEL SANA DE PACIENTE CONTROL	253
ANEXO 12.	ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO EN TÉRMINOS GO EN GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE PIEL DEL GLÚTEO DE LA PACIENTE1 VS PIEL SANA DE PACIENTE CONTROL	255
ANEXO 13.	GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN EL ESTUDIO COMPARATIVO EXPLORATORIO DE TRANSCRIPTOMA COMPLETO MEDIANTE RNASEQ ENTRE LA MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA DE LA PACIENTE1 VS PACIENTE2	257
ANEXO 14.	CLASIFICACIÓN DE LOS GENES/TRANSCRITOS EN BIOTIPOS ¹ (ENSEMBL)	261
ANEXO 15.	PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA PACIENTE1, PACIENTE2, GRUPO HOP Y CONTROLES	263
ANEXO 16.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES OSTEOGÉNICOS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN	267
ANEXO 17.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES OSTEOGÉNICOS EN CÉLULAS SAOS-2 TRATADOS CON SUERO DE PACIENTES CON HOP Y SUERO DE CONTROLES, USANDO TECNOLOGÍA N-COUNTER	269

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diagnostico diferencial con Heteroplasia Ósea Progresiva.....	45
Tabla 2. Genes implicados en la regulación osteo-adipogénica	49
Tabla 3. Colección de muestras analizadas	72
Tabla 4. Panel a diseño n-Counter de genes asociados al metabolismo óseo y lipídico	74
Tabla 5. Protocolo termociclador para ensayo miARNs en n-Counter (Nanostring).....	77
Tabla 6. Secuencias de primers para qPCR SYBR green de genes de metabolismo óseo y lipídico.....	91
Tabla 7. Secuencia de primers para genes asociados a pathways implicados en la osificación heterotópica.....	95
Tabla 8. Parámetros bioquímicos y hematológicos de las Paciente1 y Paciente2.....	101
Tabla 9. Resumen de las pautas terapéuticas usados en la Paciente1	106
Tabla 10. Procedimientos quirúrgicos realizados en la Paciente1 posterior a la progresión acelerada	114
Tabla 11. Genes con alta probabilidad >0,95 de estar diferencialmente expresados	132
Tabla 12. Proteínas diferencialmente expresadas en el grupo HOP vs el grupo Control.....	145
Tabla 13. Proteínas diferencialmente expresadas en análisis cuantitativo de Paciente1 vs el grupo Control	148
Tabla 14. Proteínas diferencialmente expresadas en la Paciente2 vs el grupo Control.....	152
Tabla 15. Proteínas diferencialmente expresadas entre la Paciente1 y la Paciente2	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación de la Heteroplasia Ósea Progresiva con otras patologías osificantes	43
Figura 2. Transcritos del complejo GNAS y variantes debido al imprinting genómico	47
Figura 3. Biomarcadores en las diferentes etapas de la diferenciación osteogénica	50
Figura 4. Rutas de señalización y factores de transcripción implicados en la modulación de la diferenciación adipo-osteogénica.....	51
Figura 5. Señalización de las rutas TGF- β /BMP en la diferenciación osteogénica.	52
Figura 6. Activación e inactivación de la ruta Wnt/ β -catenina.	53
Figura 7. Activación e inactivación de la vía Hedgehog (Hh)	53
Figura 8. Reguladores de la ruta de señalización mTOR.	54
Figura 9. Ruta de señalización Notch.....	55
Figura 10. Tipos de osificación durante el desarrollo embrionario.....	57
Figura 11. Diagrama de flujo original de opciones terapéuticas después de la administración de IGF-1 para la Paciente1	70
Figura 12. Las sondas de captura (izquierda) se hibridan con la secuencia de interés para formar un complejo de doble cadena (derecha)	75
Figura 13. Equipo n-Counter SPRINT.	75
Figura 14. Equipo HPLC (NanoLC400, Sciex) acoplado a TripleTOF 6600 (Sciex)	81
Figura 15. Esquema de la cuadrícula en la cámara de Neubauer	84
Figura 16. Secuencia de imágenes del aislamiento de células osteoblásticas a partir de una osificación.	86
Figura 17. Aislamiento de fibroblastos a partir de piel por método de explante	87
Figura 18. Aislamiento de fibroblastos a partir de piel por método de digestión enzimática	87
Figura 19. Diferentes fases acuosas en el aislamiento de células pre-adiposíticas desde tejido graso.....	88
Figura 20. Heatmap de los valores de identidad por descendencia (IBD)	99
Figura 21. Imágenes cronológicas de la progresión en la Paciente 1.....	100
Figura 22. Tejido de resección de piel de una zona con osificación	102
Figura 23. Histologías con tinción hematoxilina-eosina (HE) de tejido subcutáneo osificado de Paciente1.....	102
Figura 24. Imágenes cronológicas de la progresión en la Paciente1	103
Figura 25. Imágenes cronológicas de la progresión en la Paciente1 (2ª parte)	103

Figura 26. Marcadores de osteoinmunidad en suero de pacientes con HOP vs Controles...	104
Figura 27. Medición de marcadores séricos relacionados con el metabolismo óseo.....	105
Figura 28. Cronograma de tratamientos recibidos y evolución de la enfermedad en el Paciente1	109
Figura 29. Fotografía de las afectaciones en la Paciente1 como un fenotipo extremo de HOP.....	110
Figura 30. Imágenes clínicas de la progresión de la HOP en Paciente1	111
Figura 31. Seguimiento de biomarcadores de actividad de recambio óseo (BTM) durante el tratamiento inmunosupresor con Everolimus.....	112
Figura 32. Seguimiento de las citocinas como biomarcadores relacionados con el metabolismo óseo durante el tratamiento con Everolimus.....	113
Figura 33. Representación de CpGs diferenciales entre pacientes HOP y controles.....	115
Figura 34. Volcano plot del estado de metilación entre las pacientes con HOP vs controles	116
Figura 35. Representación de las posiciones hipermetiladas en un mismo gen en las pacientes HOP (recuadro azul) respecto a los controles	117
Figura 36. Representación de las posiciones hipometiladas en un mismo gen en las pacientes HOP con respecto a los controles.....	118
Figura 37. Sobre-representación en términos GO de las posiciones diferencialmente metiladas entre las pacientes con HOP y los controles	119
Figura 38. Sobre-representación de CpGs diferencialmente metiladas en zonas promotoras, entre las pacientes con HOP y controles	120
Figura 39. Representación de CpGs diferencialmente metiladas entre pacientes HOP	121
Figura 40. Volcano plot del estado de metilación entre las pacientes con HOP	121
Figura 41. Manhattan plot con la representación de las posiciones diferencialmente metiladas entre la Paciente1 comparada con la Paciente 2	122
Figura 42. Sobrerrepresentación de CpGs diferencialmente metiladas en todas las posiciones del genoma en la Paciente1 con respecto a la Paciente2	122
Figura 43. Representación de las posiciones diferencialmente metiladas en la Paciente1, la Paciente2 y Controles en el gen GNAS.....	123
Figura 44. Análisis de expresión génica diferencial de osificación de Paciente1 y hueso control.....	126
Figura 45. Representación de los genes involucrados significativamente en rutas biológicas detectadas en el análisis de sobre representación en clústeres.....	127
Figura 46. Análisis de expresión diferencial entre piel de Paciente1 y piel control	129
Figura 47. Análisis de miARNs en sangre de pacientes con HOP	131
Figura 48. Expression plot de HOP grave y HOP asintomático	133

Figura 49. Distribución por cromosomas de genes con probabilidad alta (> 0,95) de estar diferencialmente expresados entre HOP grave y HOP asintomático	133
Figura 50. Sobre-representación en términos GO de los genes con alta probabilidad (>0,95) de estar diferencialmente expresados entre HOP grave y HOP asintomática	134
Figura 51. Infra-representación en términos GO de los genes con alta probabilidad (>0,95) de estar diferencialmente expresados entre HOP grave y HOP asintomática	135
Figura 52. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en el análisis proteómico cualitativo.....	136
Figura 53. GO sobrerrepresentados en el grupo HOP (P-valor ajustado por BH <0,05)	137
Figura 54. Sobrerrepresentación de las proteínas identificadas en el grupo HOP relacionadas con la ruta biológica de la hemostasia (R-HSA-10958)	138
Figura 55. Sobrerrepresentación de las proteínas identificadas en el grupo HOP relacionadas con rutas de transducción de señales (R-HSA-162582)	138
Figura 56. Sobrerrepresentación de rutas de señalización del sistema inmunológico mediante citoquinas (R-HSA-1280215)	139
Figura 57. GO sobrerrepresentados en el grupo Control (P-valor ajustado por BH <0,05)	139
Figura 58. Comparación de los GO de las proteínas identificadas exclusivamente en la Paciente1 (P1) vs. la Paciente2 (P2)	140
Figura 59. Rutas biológicas asociadas a las proteínas exclusivas identificadas en la Paciente1 (P1) y Paciente2 (P2).....	141
Figura 60. Ilustración de la ruta del sistema complemento (R-HSA-166658)	141
Figura 61. Análisis de interacción proteína-proteína STRING, de la proteína CAV3 en la ruta de señalización PDGFR	142
Figura 62. Análisis de interacción de proteína-proteína en la ruta de señalización SMAD	143
Figura 63. Volcano plot de las proteínas diferencialmente expresadas en el grupo HOP frente al grupo control.....	144
Figura 64. Análisis de enriquecimiento en términos de ontología génica (GO) de proteínas desreguladas en el grupo HOP.	146
Figura 65. Sobre-representación de las rutas biológicas relacionadas con las proteínas diferencialmente expresadas en el grupo HOP	147
Figura 66. Volcano plot de las proteínas en Paciente1 frente al grupo control.....	148
Figura 67. Análisis de enriquecimiento en términos GO de proteínas desreguladas en la Paciente1 vs. el grupo Control.....	150
Figura 68. Análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas de las proteínas diferencialmente expresadas en la Paciente1 vs. el grupo control.....	151

Figura 69. Volcano plot de las proteínas séricas diferencialmente expresadas en la Paciente2 comparada con el grupo control.....	151
Figura 70. Análisis de enriquecimiento en términos GO de proteínas desreguladas en la Paciente2 vs. el grupo Control.	153
Figura 71. Análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas de las proteínas diferencialmente expresadas en la Paciente2 vs. el grupo control	154
Figura 72. Volcano plot de las proteínas diferencialmente expresadas entre Paciente1 y Paciente2	154
Figura 73. Análisis de enriquecimiento en términos GO de proteínas desreguladas en la Paciente1 vs. Paciente2	156
Figura 74. Análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas de las proteínas diferencialmente expresadas en la Paciente1 vs. Paciente2	157
Figura 75. Cultivos primarios	158
Figura 76. Niveles relativos de expresión de la proteína Gs- α (46 kDa) y de su isoforma (44 kDa).....	160
Figura 77. Localización y cuantificación de la proteína Gs- α en osteoblastos.....	161
Figura 78. Localización y cuantificación de la proteína Gs- α en fibroblastos	161
Figura 79. Localización y cuantificación de la proteína Gs- α en pre-adipocitos	162
Figura 80. Morfología de los osteoblastos de cultivo primario de hueso control y de osificación durante la diferenciación osteogénica.....	162
Figura 81. Expresión cuantitativa mediante qPCR de biomarcadores osteogénicos durante la diferenciación	164
Figura 82. Expresión de marcadores adipogénicos durante la diferenciación osteogénica..	165
Figura 83. Expresión relativa de genes de rutas conservadas en la HOP bajo inducción terapéutica	166
Figura 84. Representación morfológica de osteoblastos “like” tratados con los diferentes fármacos.....	167
Figura 85. Análisis de expresión de marcadores osteogénicos durante la diferenciación en respuesta a distintos tratamientos	170
Figura 86. Análisis de expresión de marcadores osteogénicos.....	171
Figura 87. Representación de la relación entre marcadores OPG y RANKL en la diferenciación de osteoblastos SaOS-2 tratados con suero de las pacientes con HOP	172

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Heteroplasia Ósea Progresiva (HOP)

La heteroplasia ósea progresiva (HOP), se define como una enfermedad ultra rara de tipo autosómica dominante caracterizada por la formación de hueso extra esquelético llamado osificación heterotópica (OH). Las osificaciones se forman en el tejido cutáneo, principalmente en dermis y en grasa subcutánea. Tiene una progresión gradual a tejidos más profundos como el músculo y la fascia. Se presenta en la infancia, sin embargo, hay casos reportados donde la enfermedad aparece por primera vez en una edad adulta temprana [1].

En la HOP, el grado de morbilidad depende de la localización y extensión de las OH, en algunos casos la enfermedad resulta en una discapacidad severa. Existe un retardo en el crecimiento, que puede asociarse con una restricción del movimiento de las extremidades provocada por anquilosis de la articulación y dolor en los huesos [2,3].

Debido a la naturaleza extremadamente rara de la HOP, se tiene información muy limitada sobre el pronóstico en la enfermedad.

El primer caso documentado de HOP fue en 1948, en ese entonces denominado simplemente como OH [4]. Posteriormente se emplearon diferentes nombres, entre ellos: osteoma progresivo cutáneo, osteoma cutáneo hereditario, osificación dérmica limitada, osificación heterotópica intermembranosa limitada y displasia osteodérmica. Fue en 1994 que Kaplan y sus colaboradores usaron el término “heteroplasia ósea progresiva” para dar uniformidad a la nomenclatura del trastorno y así distinguirla de síndromes asociados a OH como son la osteodistrofia hereditaria de Albright (AHO) y la Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP) [5].

1.1.1 Heteroplasia Ósea Progresiva, una enfermedad ultra rara

Las enfermedades raras están definidas como padecimientos que tienen una prevalencia en el rango de 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes [6]. En Europa, se consideran en esta categoría, aquellas con prevalencia menor o igual a 5 pacientes por cada 10,000 habitantes [7]. En una subcategoría se encuentran las enfermedades ultra raras [8], definidas así por tener una prevalencia aproximada de 1 caso por cada 2,000,000 de habitantes [9].

La principal característica de las enfermedades ultra raras es que son heterogéneas, en su mayoría de tipo crónico y potencialmente mortales. El reto a nivel de investigación es mayor comparado con las enfermedades comunes [10]. Son reconocidas como un problema de salud importante y un objetivo claro en las políticas de la Unión Europea [11–14]. Su estudio se basa principalmente en la investigación básica y en una adaptación de la investigación clínica debido a su complejidad intrínseca [15]. Los principales obstáculos de su investigación son la inadecuada aplicación de metodologías, ya que requieren una adaptación de los análisis a poblaciones pequeñas y clínicamente heterogéneas, sin embargo, al igual que en las enfermedades comunes la estadística y la probabilidad son leyes que deben ser aplicadas adecuadamente para obtener evidencias científicas válidas que den soporte a los estudios clínicos [16–19]. Otro de estos obstáculos es la escasez de financiación [20]. Existen barreras claras, como son: i) la dificultad para identificar a los pacientes, debido a la falta de conocimiento sobre dichas enfermedades, a la complejidad en la definición de signos y síntomas, así como los recursos para realizar un correcto diagnóstico; ii) el registro de los pacientes; y finalmente, iii) su seguimiento [21]. Estas barreras son las principales causas de la incompreensión que existe de la historia natural de las enfermedades raras, a lo que hay que sumar la dispersión geográfica de los casos que dificulta el diseño de ensayos clínicos adecuados [11].

Una herramienta fundamental en el estudio de las enfermedades raras es la genómica, la cual ha permitido la secuenciación del genoma completo o la secuenciación completa de

exomas, lo cual ayuda a establecer asociaciones entre cambios en el genoma (mutaciones) y muchas de las enfermedades raras. Se estima que cada cigoto tiene aproximadamente de 70 a 80 mutaciones en su genoma, lo que representa una pequeña posibilidad de padecer una enfermedad rara o ultra rara. Eso dependerá de la posición donde se localicen dichas mutaciones [22–24].

Se sabe que gran parte de las enfermedades ultra raras son causadas por mutaciones *de novo*, es decir, no hereditarias, que se localizan en zonas codificantes a proteínas funcionalmente importantes [23]. De esta manera, la investigación de éstos padecimientos se realiza estudiando numerosas familias [25,26] en el caso de que la enfermedad este asociada a rasgos de herencia dominante; o bien, a tríos de paciente-padres en caso de que la enfermedad sea espontánea [27]. La validación de éstas asociaciones deben realizarse con estudios funcionales *in vitro* e *in vivo* que demuestren y confirmen que las variantes genéticas tienen un efecto [25–28] y pueden causar, empeorar o coadyuvar a la enfermedad.

La identificación de estas variantes asociadas con la enfermedad sirve como confirmación de una sospecha diagnóstica en una enfermedad rara. Y gracias a los avances tecnológicos, como es el caso de la secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés *Next-Generation Sequencing*), han permitido el incremento en la capacidad de diagnóstico de enfermedades monogénicas. Además de mejorar el entendimiento de la etiopatogenia [29].

1.1.2 Clasificación de la HOP como enfermedad

1.1.2.1 Clasificación internacional de enfermedades CIE-10

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado un manual para la clasificación internacional de las enfermedades (CIE) asignándoles un código único que permite estandarizar la terminología médica y facilitar la recopilación de datos epidemiológicos y de gestión sanitaria. Sirve así, para realizar un registro, análisis, interpretación y comparación de los datos de las diferentes patologías [30,31]. Este manual incluye una variedad de signos, síntomas y los hallazgos anormales de las enfermedades.

La clasificación vigente es la CIE-10 (décima edición) en España CIE-10-ES, aprobada en 1990 la cual se utiliza en más de 150 países traducida a más de 40 idiomas y que cita más de 20,000 artículos científicos. La OMS realiza actualizaciones cada uno a tres años, incluyendo modificaciones, adaptaciones y algunas necesidades clínicas. En mayo del 2019 se presentó la nueva edición CIE-11 en la Asamblea Mundial de la Salud, la cual entrará en vigor en el 2022 [30,32].

HOP se clasifica, según la CIE-10 [33] dentro del capítulo XIII que engloba las enfermedades del sistema osteomuscular y del tejido conjuntivo. El tejido conectivo derivado del mesodermo es el tejido más abundante en el organismo y le provee soporte y estructura. Entre ellos se encuentran el cartílago, hueso, ligamentos, tendones y piel, entre otros. El tejido conectivo se divide en tres tipos mayormente: el tejido conectivo laxo o blando (que envuelve a los órganos), el tejido conectivo denso (hueso y cartílago) y la sangre [34]. Dentro del capítulo XIII se clasifican las artropatías infecciosas; politropías inflamatorias; trastornos sistémicos del tejido conjuntivo; dorsopatías. Así como patologías de tipo autoinmunes con daño tisular persistente en articulaciones, piel, riñón, vasos sanguíneos etc. Además de incluir trastornos de los tejidos blandos como son; osteopatías y condropatías; y otros trastornos del sistema osteomuscular y del tejido conjuntivo [35].

Siguiendo la cascada de clasificación, la HOP entra dentro de la categoría M60-M79 de los trastornos de los tejidos blandos, en donde se incluyen los trastornos de los músculos (M60-M63) que incluyen la atrofia y distrofia muscular, *miastenia gravis*, disgenesia muscular y

mioclonías [36]. Se incluye también la subcategoría M61. Calcificación y osificación del músculo, comprendiendo la miositis osificante traumática, miositis osificante progresiva, calcificación y osificación paralítica del músculo, calcificación y osificación de los músculos asociadas con quemaduras. Y finalmente la categoría final M61.5 que clasifica a Otras osificaciones del músculo que considera a la Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP) y la Heteroplasia Ósea Progresiva (HOP).

1.1.2.2 Clasificación Orphanet

Orphanet es un consorcio conformado por más de 40 países. Fue fundada en Francia por el INSERM (Instituto Nacional Francés de la Salud y de la Investigación Médica) y apoyado por subvenciones europeas desde el 2000. Dicho consorcio tiene como propósito el acceso libre y equitativo de información de alta calidad sobre enfermedades raras. Incluyen una nomenclatura especial para estas enfermedades (código ORPHA) que ayuda a su visualización en los sistemas de información clínicos y de investigación, mejorando así el diagnóstico, tratamiento y atención a los pacientes con dichas patologías. El sistema incorpora información de enfermedades con los genes implicados y su clasificación, inventario de medicamentos huérfanos y directorios de centros de salud expertos en cada una de las enfermedades raras, asociaciones de pacientes, laboratorios que ofrecen pruebas diagnósticas específicas para enfermedades raras, proyectos, ensayos clínicos y registro de biobancos activos [37].

Orphanet sitúa a la HOP dentro de cuatro clasificaciones: anomalías raras del desarrollo embrionario, enfermedades genéticas raras, enfermedades dermatológicas raras y enfermedades óseas raras.

Las anomalías raras del desarrollo durante la embriogénesis se definen como defectos congénitos o anomalías estructurales de la conducta, funcionales y metabólicas que se producen durante la organogénesis. Son la causa principal de mortalidad infantil y tienen una incidencia de entre el 2 – 3% de los recién nacidos. A un 15% de los casos se le atribuye como causa la presencia de mutaciones genéticas y alteraciones cromosómicas; a los factores ambientales un 10%; la combinación de ambas del 20-25%; embarazos gemelares del 0,5-1%; y, el mayor porcentaje (40-60%) es por causas desconocidas [38]. Dentro de ésta clasificación se incluyen las malformaciones del sistema nervioso, anomalías del desarrollo de origen metabólico, trastorno del desarrollo sexual, trastornos raros del desarrollo del hueso, defectos raros del desarrollo asociados al tejido conectivo, la piel y la mucosa, anomalías vasculares o angiomas [37].

En cuanto a las enfermedades genéticas raras, la característica principal es su complejidad debido a una heterogeneidad genética y fenotípica [39]. Existen aproximadamente 6000 trastornos genéticos raros de los cuales un 10% están ligados al cromosoma sexual, 32% son autosómicos dominantes y un 45% autosómicos recesivos. El 83% de todas las enfermedades raras genéticas afecta la población infantil [40]. En esta clasificación se encuentran los trastornos raros con bases genéticas relacionados con el sistema inmune, enfermedades raras de la piel, trastornos neurológicos, hematológicos, hepáticos, cardíacos, de hueso entre otros [37].

Como enfermedades dermatológicas rara, la HOP, junto con la epidermólisis bullosa (EB), está incluida en el grupo de enfermedades hereditarias de la piel caracterizadas por la aparición de ampollas; trastornos hereditarios de cornificación como es la Ictiosis; o displasias ectodérmicas (Eds) [41].

Las enfermedades óseas raras, son trastornos que pueden ser congénitos, crónicos y de origen genético y afectan cartílago, huesos y dientes. Están categorizadas en dos grupos: displasias esqueléticas y enfermedades metabólicas de hueso, dentro de esta última categoría se

encuentran: osteogénesis imperfecta; Acondroplasia; Fibrodysplasia-Síndrome de McCune-Albright; y Pseudoparatiroidismo (PHP) [42].

La clasificación de Orphanet para las enfermedades raras óseas (ORPHA:93419) incluye:

- i) disostosis (ORPHA:364559): trastornos que involucran defectos en la osificación en huesos individuales o en conjunto [43];
- ii) displasia ósea primaria (ORPHA:364526): trastornos del cartílago y hueso, asociados con anomalía en el desarrollo, moldeado, mantenimiento y tamaño del esqueleto [44,45];
- iii) enfermedad por almacenamiento lisosomal con afectación esquelética (ORPHA:93448): grupo de enfermedades genéticas que involucran una disfunción en la actividad de las hidrolasas lisosomales, comprometiendo la función celular en tejidos como hueso, médula ósea o piel [46];
- iv) osteomalacia oncogénica (ORPHA:352540): insuficiencia de mineralización ósea inducida por tumor, causado por la secreción del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) [47];
- v) osteonecrosis (ORPHA:399158) o necrosis avascular, puede producirse por traumatismos, enfermedades autoinmunes, pancreatitis, el uso de corticosteroides, entre otros [48,49];
- vi) síndrome de Saliker (ORPHA:300493), un padecimiento que se presenta en pacientes con enfermedad renal crónica tardía y un hiperparatiroidismo secundario, y que se caracteriza por el desarrollo de deformidades maxilares, mandibulares y nasales así como de neoplasmas benignas de tejido blando oral [50];
- vii) síndrome óseo vascular congénito (ORPHA:235832) enfermedad que causa el aumento (angio-osteohipertrofia) o reducción en el crecimiento de los huesos largos (angio-osteohipotrofia) debido a una malformación vascular congénita [51]; y,
- viii) tumor óseo raro (ORPHA.68411): los sarcomas óseos malignos primarios tienen del 5 al 10% de incidencia [52].

1.2.1.3 Otras clasificaciones

La HOP se incluye dentro del grupo de padecimientos que causan osificación heterotópica y como subclase de la osificación muscular (subclase osificación heterotópica y calcificación del músculo); osificación heterotópica congénita asociada morfológicamente a metaplasia ósea (subclase osificación heterotópica y enfermedad congénita; clasificación patológica -deposición de calcio en tejidos sin deposición normal de calcio) [53] (*Figura 1*).

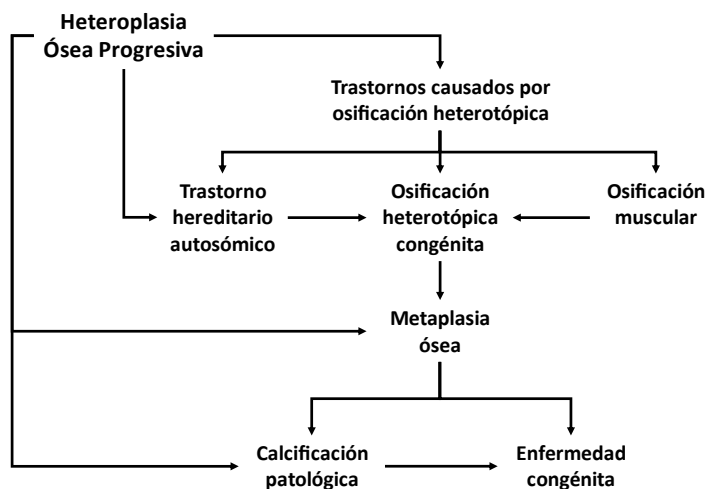


Figura 1. Relación de la Heteroplasia Ósea Progresiva con otras patologías osificantes

1.2 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA

Clínicamente la HOP tiene estrechas similitudes con otros trastornos que producen OH, de las cuales tiene que ser diferenciada (*Tabla 1*) considerando: su base genética, la asociación del desarrollo de las osificaciones por componentes no genéticos como son heridas o artropatías, edad en la que aparece el trastorno, neoplasias o condiciones que involucren incremento en los niveles de calcio-fosfato [54].

Dentro del espectro de los trastornos genéticos con formación de OH de los que hay que diferenciar a la HOP se encuentra, el osteoma cutis primario, la AHO, el PHP, el pseudopseudohipoparatiroidismo (PPHP) y la FOP [55].

El osteoma cutis se refiere a la OH en tejido subcutáneo que puede ser de tipo primario, en zonas sin lesión precedente; secundario, de tipo metastásico, en casos con anomalías del metabolismo paratiroideo; o distrófica, cuando la osificación se desarrolla en una zona lesionada o con proceso inflamatorio preexistente. Puede presentarse en placas de osificación cuando se acompaña de mutación en el gen *GNAS* [56].

La AHO se caracteriza por i) desarrollo de osificaciones heterotópicas superficiales; ii) corta estatura en la etapa adulta; iii) obesidad; iv) braquidactilia; v) cara redonda; vi) problemas neuroconductuales y trastorno del desarrollo intelectual; y vii) disminución en los niveles de proteína $G\alpha$ (principal proteína de *GNAS*) [57,58].

El PHP comprende un grupo de trastornos caracterizados por resistencia del órgano diana a la hormona paratiroidea (PTH) y a otras hormonas como la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRG), dependiendo de sus características clínicas y moleculares se subclasifica en PHP1a, 1b y 1c [59,60]. La PHP1a y 1c son clínicamente idénticas con fenotipo AHO, resistencia plurihormonal, y mutaciones de alelo materno en el gen *GNAS*, diferenciándose solo en que la PHP1c mantiene la actividad eritrocitaria de la $G\alpha$ [61]. Por otro lado la PHP1b se caracteriza por un patrón paterno-específico de metilación en el transcrito A/B (materno) de *GNAS*, lo que conduce a la

disminución de la expresión de la proteína Gs- α en los túbulos proximales renales y una resistencia a la PTH; además presenta hipocalcemia, hiperfosfatemia e hiperparatiroidismo secundario sin fenotipo AHO [60,62].

La PPHP es una condición que se presenta en pacientes con AHO pero guardando una normalidad en la respuesta a la PTH y sin mostrar obesidad severa, lo que se atribuye a la mutación en *GNAS* en el alelo paterno [55,63].

La FOP es una enfermedad rara que se caracteriza por la formación de OH en tejido músculo esquelético y tejido conectivo blando con progresión a las articulaciones, dificultando o imposibilitando el movimiento de las zonas afectadas (cuello, espalda, hombros, codos, cadera, rodilla, muñecas, tobillos y mandíbula) y anquilosis o fusión eventual de las articulaciones. Presenta malformaciones congénitas como dedos gordos de los pies y el dedo gordo del pie acortado con un primer metatarsiano distal malformado, con falta o anomalía de la primera falange y/o articulación interfalángica. Otras características fenotípicas incluye microdactilia y/o fijación permanente del quinto dedo con una posición doblada (clinodactilia), osteocondromas de tibia medial proximal, malformaciones de la columna vertebral y cuello del fémur anormalmente corto [64,65]. Los primeros episodios se presentan durante la infancia progresando a lo largo de la vida. En la mayoría de los casos la FOP resulta de una mutación esporádica o *de novo* en el gen *ACVRI* la cual afecta a la ruta biológica de la proteína morfogénica, fundamental en la formación ósea en la embriogénesis y después del nacimiento [66,67].

Tabla 1. Diagnostico diferencial con Heteroplasia Ósea Progresiva

	Osteodistrofias hereditarias de Albright		No-Osteodistrofias hereditarias de Albright		
	PHP1A	PPHP	PHP1B	Osteoma cutis	HOP
Herencia	Mutación inactivante en el alelo materno de <i>GNAS</i> que codifica para Gs- α	Mutación inactivante en el alelo paterno de <i>GNAS</i> que codifica para Gs- α	Pérdida de <i>imprinting</i> de metilación <i>GNAS</i> maternas, deleciones en <i>GNAS</i> o <i>STX16</i> , inversiones de regiones <i>GNAS</i> ; formas autosómicas dominantes y esporádicas	Mutación inactivante en el alelo paterno de <i>GNAS</i> que codifica para Gs- α (en la mayoría de los casos)	Mutación inactivante en el alelo paterno de <i>GNAS</i> que codifica para Gs- α
	Rara vez debido a un defecto <i>imprinting</i> en <i>GNAS</i>			Excepción: en la primera infancia puede ser el único signo de PHP1A	Raramente puede ocurrir una síndrome de superposición de PHP1A/POH
Características clave del fenotipo clínico	Obesidad, a menudo grave Obesida Ligeramente bajo para el peso al nacer de inicio temprano Apnea del sueño Osificaciones subcutáneas	No obeso Pequeño para la edad gestacional al nacer Osificaciones subcutáneas	El sobrepeso/obesidad puede ocurrir en adultos pero más leve que en PHP1A Obesidad de inicio temprano Macrosomía al nacer Las osificaciones subcutáneas son muy raras.	No obeso Las osificaciones subcutáneas son el único signo	No obeso, a menudo pequeño para la edad gestacional; delgado al nacer Las osificaciones heterotópicas pueden penetrar más profundamente en el tejido conectivo, el músculo y otros tejidos. Estatura normal
	Baja estatura en la edad adulta. Braquidactilia Déficits cognitivos comunes	Baja estatura en la edad adulta Braquidactilia Déficit cognitivo poco claro	Estatura normal de adulto Braquidactilia leve ocasional Sin déficits asociados	Estatura normal Sin braquidactilia Sin déficits asociados	Sin braquidactilia Sin déficits asociados
Resistencias hormonales	PTH TSH GHRH Gonadotropinas Calcitonina Glucagón	Ninguna	PTH TSH (ocasionalmente presente, si es así, leve) Calcitonina	Ninguna	Ninguna

PHP1A, pseudohipoparatiroidismo tipo A; PPHP, pseudopseudohipoparatiroidismo; PHP1B, pseudohipoparatiroidismo tipo B; HOP, heteroplasia ósea progresiva; PTH, hormona paratiroidea; TSH, Tirotrópica; GHRH, hormona liberadora de hormona de crecimiento.

Para diagnosticar la HOP se consideran criterios específicos como el desarrollo de OH superficiales y profundas, no más de dos características propias de AHO (sin considerar la OH), delgadez, no resistencia a la PTH, determinación de mutación inactivante en *GNAS* en el alelo paterno, evidencia de patrones reticulares en las osificaciones, OH de tipo intramembranosa o intramembranosa/endocondral y comienzo de la enfermedad antes del primer año de vida [54,55,68].

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA

La HOP se caracteriza por ser un trastorno causado por mutaciones inactivantes en el gen *GNAS* y por la cual los portadores desarrollan osificaciones heterotópicas subcutáneas con progresión a tejido conectivo [69].

Las mutaciones en *GNAS* específicas de HOP, ocurren aleatoriamente como resultado de un cambio espontáneo (mutación *de novo*) o por herencia autosómica dominante de algún de los padres, lo que significa que una de las copias heredadas presenta la mutación, esto es suficiente para que se produzca la enfermedad.

1.3.1 *GNAS* en la Heteroplasia Ósea Progresiva

El gen *GNAS* (*Guanine Nucleotide Binding Protein Alpha Stimulating Activity Polypeptide 1*) codifica para la subunidad alfa de la proteína G estimulante (Gs- α) la cual es esencial en la vía de transducción de señales involucradas en la regulación hormonal y el crecimiento celular [70–72]. La unión de Gs- α a dominios transmembranales GPCrs (receptores unidos a la proteína G, por sus siglas en inglés) estimulados por hormonas y neurotransmisores, lo que provoca la activación el receptor adenilato ciclasa que convierte adenosina trifosfato a adenosín monofosfato cíclico que desempeña un papel clave en señalizaciones que regulan el desarrollo y la homeostasis ósea [73].

GNAS está localizado en el brazo largo del cromosoma 20 (20q13.32) y es de los genes más complejos del genoma humano, ya que genera diversos transcritos codificantes y no codificantes, los cuales utilizan promotores alternativos y diferentes exones [74,75]. *GNAS* es un gen enigmático, es que la mayoría de sus productos génicos presentan un patrón de expresión alelo específico de uno de los padres, lo que se denomina *imprinting* genómico que es el factor determinante de la variabilidad fenotípica del gen [76].

1.3.1.1 *Imprinting* genómico

El *imprinting* genómico es un fenómeno por el cual algunos genes se expresan monoalélicamente dependiendo de su origen parental, es decir, una de las copias está activa y se transcribe en proteínas, mientras que la otra esta silenciada por la presencia de una "impronta" de marca estable, que interfiere con la regulación de las proteínas de unión, evitando la transcripción. El silenciamiento génico ocurre mediante la adición de grupos metilo durante la gametogénesis, manteniéndose durante toda la embriogénesis. Independientemente de su origen paterno o materno, algunos genes están silenciados en las células germinales [77,78].

Algunas de las enfermedades osificantes, como HOP, PHP1 y AHO, son resultado de mutaciones heterocigotas inactivantes en *GNAS* regulado por *imprinting* genómico. Cuando la mutación es heredada por el alelo materno resulta en AHO y/o PHP1, mientras que las heredadas por el padre resultan en HOP [55,79–81]. Por otro lado, Happle *et al.* 2016 y 2021, ha propuesto como causa de la HOP una pérdida de heterocigocidad en *GNAS* en etapas tempranas postcigóticas, lo que se denomina como mosaicismo superpuesto bialélico segmentario [82,83].

La presencia de una mutación inactivante en *GNAS* por si sola o por patrones de mutación dentro del gen, no pueden predecir la variabilidad del fenotipo, severidad o progresión de la HOP.

1.3.1.2 Locus *GNAS* y sus transcritos

El locus *GNAS* genera diversos transcritos expresados a partir del alelo materno y/o paterno, los cuales inician en promotores y exones únicos, pero que comparten exones comunes *downstream* (exones 2-13) del locus [54,84,85] (**Figura 2**).

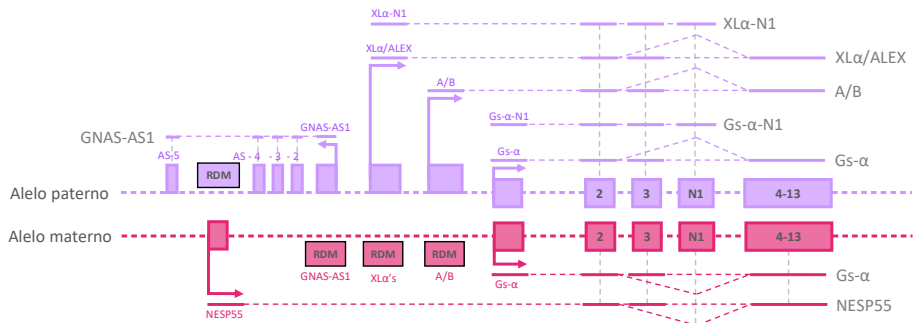


Figura 2. Transcritos del complejo *GNAS* y variantes debido al imprinting genómico

El principal producto de *GNAS*, la proteína *Gs-α*, esta generada por el exón 1 que a pesar de estar desmetilado en ambos alelos, sufre *imprinting* genómico de manera tejido-específica, expresándose mayoritariamente, desde el alelo materno, en tejidos como tubo proximal renal, tiroides, glándula pituitaria y ovarios [86–88]. Su expresión bialélica se ha demostrado en linfocitos, glándulas adrenales, adipocitos y células óseas [89–91].

Otro de los transcritos expresados por el alelo materno es la proteína neuroendocrina secretora (NESP55), que se genera por el promotor más *upstream* de *GNAS* y no guarda relación, ni estructural, ni funcionalmente con *Gs-α* [92,93]. Se expresa en tejidos neuroendocrinos, sistema nervioso central y en algunos tejidos endocrinos [94,95].

El siguiente promotor genera la expresión de la isoforma de *Gs-α* (XLS- α), la cual es expresada por el alelo paterno y es estructuralmente similar a *Gs-α*, excepto por la presencia de un N-terminal extra largo [96,97]. XLS- α es expresado exclusivamente del alelo paterno en todos los tejidos, expresándose con mayor abundancia en tejidos neuroendocrinos, cerebro, páncreas, corazón, riñones y tejido adiposo [98–100]. Por otro lado, se ha determinado la existencia de una variable bialélica de XLS- α expresada en células estromales [101,102]. Otras variables identificadas son: i) XLS- α -N1 la cual se produce por la inclusión de secuencias desde dos exones adicionales, A20 y A21, localizados inmediatamente después del exón XL [98]; ii) ALEX generada por un segundo ORF de los mRNA de XLS- α , es más pequeña por que usa un codón de terminación localizado dentro del exón XL [103,104].

El transcrito anti sentido y el A/B son del tipo no codificante pero similarmente a otras moléculas no codificantes de ARN tienen un rol en la regulación génica, en este caso en la regulación de *GNAS* [105–108].

1.3.1.3 *GNAS* y la diferenciación celular

La proteína Gs- α está implicada en procesos de diferenciación celular hacia linajes osteoblásticos [109], adipogénicos [110], condrogénicos [111], miogénicos [112] y neurogénicos [113].

En el contexto de la HOP, la mutación en el gen *GNAS* causa una diferenciación de las células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) errante, siendo que la proteína Gs- α es capaz de mantener un balance entre osteogénesis/adipogénesis [109,110,114,115].

El proceso de diferenciación osteogénica inicia con la determinación del *commitment* de células precursoras y diferenciación a pre-osteoblastos para terminar con la maduración osteoblástica. La maduración de osteoblastos incluye diferentes etapas identificadas por la expresión de marcadores específicos. En la primera etapa se lleva a cabo la proliferación celular, expresándose colágeno tipo I, receptor de factor de crecimiento transformante beta (*TGF- β*) y osteopontin (*OPN*). En una segunda etapa las células salen del ciclo celular y comienzan a diferenciarse mientras realizan la síntesis y maduración de la matriz extracelular con la expresión del colágeno tipo I y la fosfatasa alcalina (*ALPL*). Y una última etapa de mineralización de la matriz cuando la osteocalcina (*OC*) promueve los depósitos de minerales. En esta etapa los osteoblastos adquieren morfología cuboidea [116–118].

El proceso de adipogénesis se caracteriza por dos etapas, la determinación del *commitment* durante la cual, los pre-adipocitos son morfológicamente iguales a sus precursores mesenquimales (MSCs) con un fenotipo fibroblástico. Durante la etapa terminal de diferenciación, los adipocitos cambian morfológicamente y adquieren las funciones de síntesis y almacenamiento de lípidos [119,120].

Durante cada etapa de la diferenciación, se expresan diferentes marcadores y factores de transcripción que son indispensables en la regulación de formación de hueso o grasa (**Figura 3, Tabla 2**).

La osteogénesis y adipogénesis están mediados principalmente por los factores de transcripción Runx2 y PPAR γ respectivamente, los cuales inician y promueven la diferenciación celular por la activación de diversas rutas de señalización como son la ruta Wnt/ β catenina, TGF- β , proteínas morfogénicas de hueso (BMP, por sus siglas en inglés), la ruta diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, por sus siglas en inglés) y Hedgehog (Hh) principalmente [116,121–124].

Runx2 activa y regula la diferenciación osteogénica mediante la ruta Wnt, BPM y Hh, mientras que PPAR γ tiene características anti-osteoblásticas y pro-adipogénicas, ya que es indispensable tanto en el *commitment* como en las diferentes fases de la diferenciación adipogénica [125–127].

Se ha demostrado la implicación de *GNAS* en la regulación de la diferenciación de las MSCs impactando en el balance de las rutas de señalización implicadas en la osteogénesis y adipogénesis [128–130].

En la HOP la inactivación de Gs- α del alelo paterno en células estromales adipogénicas, aumentan la diferenciación osteogénica, promoviendo la osificación intramembranosa en la grasa subcutánea [114]. Por lo que la Gs- α es crucial en el mantenimiento del balance entre las rutas Wnt/ β catenina y Hh [130,131].

Tabla 2. Genes implicados en la regulación osteo-adipogénica

Entrez ID gen	Símbolo del gen	Proteína	Función	Ref.
2943	<i>DKK1</i>	Proteína relacionada con Dickkopf 1	Codifica para la familia de proteínas Dickkopf las cuales se unen al correceptor LRP6 para inhibir la ruta Wnt/ α -catenina. Se expresa al inicio de la diferenciación osteogénica siendo clave en el desarrollo del tejido óseo	[132][133]
1277	<i>COL1A1</i>	Cadena Colágeno alfa tipo I	Principal constituyente de la matriz ósea. Marcador temprano de diferenciación osteoblástica	[134][135]
860	<i>Runx2</i>	Factor 2 de transcripción Runt	Principal factor de transcripción de osteoblastos. Regula la proliferación y el <i>commitment</i> de los progenitores osteoblásticos, y de los genes que codifican para proteínas de matriz ósea	[136], [137], [138]
650	<i>BMP2</i>	Proteína morfogénica ósea 2	Induce la formación de cartilago y hueso. Facilita la diferenciación osteogénica induciendo la actividad de fosfatasa alcalina y promoviendo la calcificación. Media otros marcadores osteogénicos como OC y Col-1	[139], [140]
3570	<i>IL6R</i>	Receptor subunidad alfa de la interleucina 6	Es un regulador de la diferenciación osteoblástica e inductor de apoptosis de células osteogénicas maduras	[141],[142]
3553	<i>IL1B</i>	Interleucina 1 beta	Activador de RANK/RANKL promoviendo así la osteoclastogénesis	[143]
8313	<i>Axin2</i>	Axin-2	Inhibidor de la ruta de señalización Wnt, disminuyendo la expresión de β catenina	[144] [145]
249	<i>ALPL</i>	Fosfatasa alcalina asociada a la biomineralización	Isoenzima sintetizada por osteoblastos, reguladora de los niveles de bio fosfatos e implicada en la mineralización ósea	[146], [147]
121340	<i>SP7</i> <i>/Osterix</i>	Factor de transcripción Sp7	Factor de transcripción esencial en la osteoblastogénesis. Regula la expresión de las proteínas de matriz extracelular involucradas en la diferenciación osteoblástica	[148]
7040	<i>TGF-beta</i>	Factor de crecimiento transformante Beta 1	Controla la diferenciación osteoblástica y osteoclástica	[149], [150]
64093	<i>SMOC1</i>	SPARC, Related Modular Calcium-Binding 1	Llamada también Osteonectina, es un inductor de la diferenciación osteoblástica promoviendo la expresión de otros genes involucrados en el crecimiento celular	[151]
632	<i>BGLAP</i>	Osteocalcina	Se expresa principalmente en osteoblastos en respuesta a factores de crecimiento, hormonas o procesos patológicos	[152]
4982	<i>TNFRSF11B</i> <i>/OPG</i>	Miembro 11B de la superfamilia del receptor de TNF	Inhibidor de la osteoclastogénesis y su actividad por la supresión del receptor ligando RANKL	[153]
8600	<i>TNFSF11</i> <i>/OPGL</i>	Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B	Ligando osteoblástico e inductor de la diferenciación osteogénica	[154]
50964	<i>SOST</i>	Esclerostina	Actúa como inactivante de la ruta Wnt/ β -catenina suprimiendo la formación ósea	[155]
123	<i>PLIN2</i>	Periplin-2	Se expresa en las células progenitoras durante la diferenciación osteoblástica, así como en osteoblastos maduros. Además, regula la lipofagia y la degradación proteosomal	[156]
3952	<i>Leptina</i>	Leptina	Promueve diferenciación osteogénica induciendo la expresión de Cbfa1, ALP, COL-1 y BGLAP	[157]
1035	<i>NAMPT</i>	Nictamida fosforibosiltransferasa	Promueve diferenciación osteoblástica y osteoclástica por activación de NF κ B y secreción de IL-6	[158]
5468	<i>PPARG</i>	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas	Regula la adaptación metabólica y el aumento de la respiración mitocondrial eventos necesarios para una eficiente diferenciación y mineralización de los osteoblastos	[159]
9370	<i>ADIPOQ</i>	Adiponectina	Regulador negativo del metabolismo óseo (formación ósea/ reabsorción ósea)	[160][161]

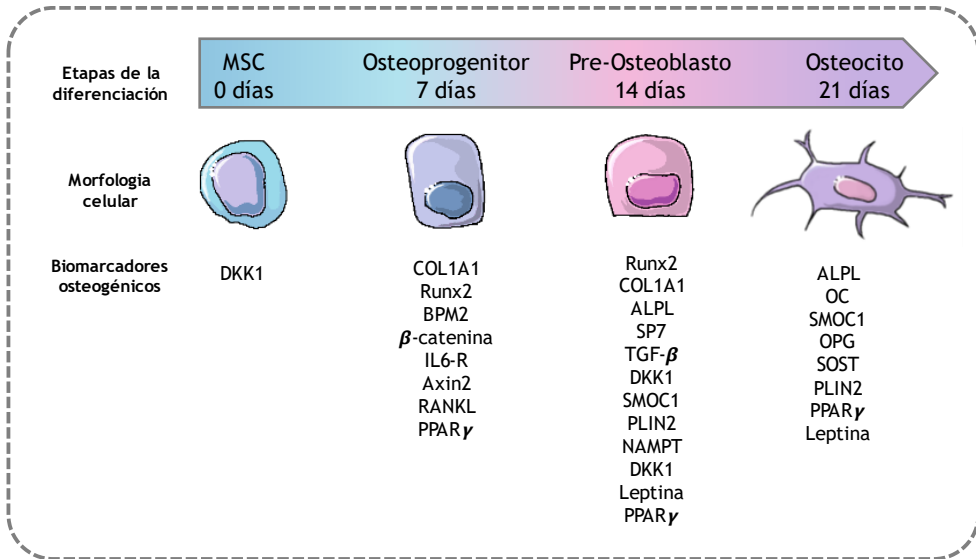


Figura 3. Biomarcadores en las diferentes etapas de la diferenciación osteogénica

1.3.1.3.1 Rutas de señalización implicadas en diferenciación adipo-osteogénica

El balance en la diferenciación de las MSCs hacia adipocitos u osteoblastos está determinado por la acción de rutas de señalización precisas y factores de transcripción claves que permiten una correcta activación y/o inhibición de los procesos de diferenciación. Estas rutas están comprendidas por: i) TGF- β /BMP que tiene funciones en la regulación de la osteoblastogénesis y adipogénesis [162]; ii) Wnt/ β -catenina activa osteogénesis e inhibe adipogénesis [163,164]; iii) Hh funcionalmente pro-osteogénico y anti-adipogénico [165,166]; iv) Notch participa en la regulación de ambos procesos de diferenciación en conjunto con otras rutas de señalización [167,168]. La ruta mTOR ha demostrado ser determinante en el linaje celular al cual cambiarán las células madre, induciendo la diferenciación osteoblástica y adipogénica [125–127].

Proteínas como las FGFs y la familia de las proteínas de matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) unidas a las integrinas, participan activamente en la regulación del balance adipo-osteogénico. FGFs puede activar diferentes señalizaciones (ERK1/2, MAPK, PI3K, etc) con importante función en la diferenciación de las MSC's, mientras que las ECM-unidas a integrinas actúan como moléculas pro-adipogénicas coordinando la diferenciación de los pre-adipocitos [169–171].

El balance entre la osteogénesis y adipogénesis requiere de una regulación delicada en la que intervienen factores de transcripción claves en ambos procesos como son Runx2 y Osterix o PPAR γ y C/EBPs respectivamente [172] (*Figura 4*).

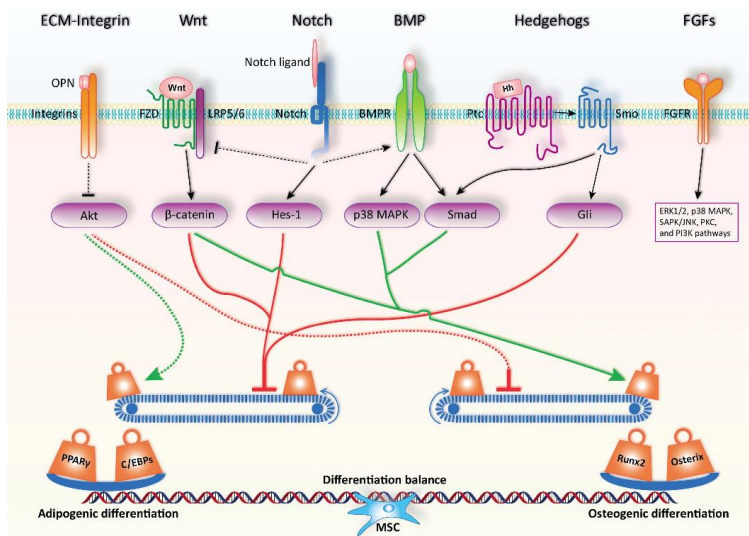


Figura 4. Rutas de señalización y factores de transcripción implicados en la modulación de la diferenciación adipo-osteogénica
 OPN, osteopontina; FZD receptor Frizzled; Hh Hedgehog; Ptc, Pached; Smo, Smoothened.
 Con permiso de *Creative Commons* [172]

1.3.1.3.2 Ruta de señalización TGF- β /BMP

La super familia de proteínas TGF- β que comprende las proteínas BMP, las cuales tienen actividad reguladora en la proliferación, diferenciación y migración celular. Tienen, además, una función reguladora bimodal, por un lado en el proceso de osteogénesis participando en la condensación de las MSCs, la diferenciación osteoblástica, la morfogénesis del hueso y el crecimiento de placa ósea; y por otro lado, regulando el proceso de adipogénesis; ambos desregulados en la HOP [150,162] (**Figura 5**).

La TGF- β es sintetizada y almacenada en la ECM. Su activación depende del proceso de reabsorción ósea. Cuando se activa, se une a los receptores T β RI-II y activa la señalización de la ruta canónica dependiente de Smad y la ruta no-canónica independiente de Smad, que activa la ruta MAPK fosforilando a Runx2 y promueve su actividad transcripcional; mientras que Smad 2/3 recluta HDAC para antagonizar la actividad de Runx2.

El complejo TGF- β -Smad promueve la proliferación, quimiotaxis y diferenciación de osteoprogenitores en etapas tempranas, sin embargo, también funciona como inhibidor de la maduración osteoblástica, mineralización y transformación a osteocitos. Tiene una funcionalidad bimodal en la diferenciación osteoclástica, inhibiéndola al disminuir la secreción del ratio RANKL/OPG y promoviéndola por su unión directa a los receptores osteoclásticos [173,174].

Por su parte, la BMP se une a receptores homomérico de tipo II, el cual activa la ruta de la Smad, que se transloca al núcleo y recluta cofactores y a Runx2 para regular la expresión de genes asociados a la osteogénesis, como son *Runx2*, *Dlx5* y *OSX*. El complejo BMP-Smad es un promotor en cada etapa de la diferenciación y maduración osteoblástica [175].

La activación de la ruta TGF-β/BMP participa en la regulación tanto de la osteogénesis como adipogénesis, a través de la regulación de los factores de transcripción Runx2 y PPARγ, que pueden ser regulados por el complejo Smad o por MAPK. La desregulación de esos factores de transcripción afectan directamente el control del *commitment* en la diferenciación de las MSCs [172,176].

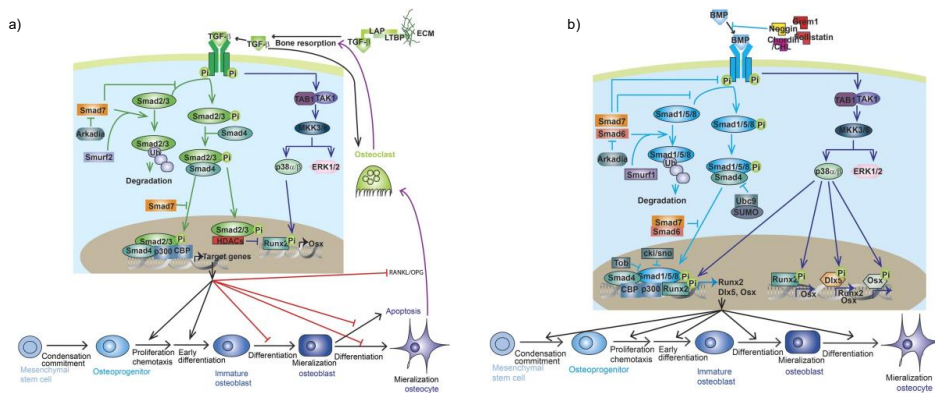


Figura 5. Señalización de las rutas TGF-β /BMP en la diferenciación osteogénica.

- a) Efecto de la ruta TGF-β como inductor de la proliferación y diferenciación osteoblástica; b) Activación de la ruta BMP y expresión de factores pro-osteogénicos.
- Con permiso de Creative Commons [150]

1.3.1.3.3 Ruta de señalización Wnt/β catenina

La familia de glicoproteínas ricas en cisteínas (Wnts) son proteínas secretadas por la ECM, las cuales, a través de su unión a receptores, activan señalizaciones que controlan la expresión génica dirigida al control de la proliferación, el *commitment* celular y la diferenciación de las MSCs. La señalización de Wnt actúa mediante la ruta canónica a través de la β-catenina, y la no-canónica mediada por proteínas G, ambas implicadas en la regulación de la diferenciación osteogénica y adipogénica [177,178].

La ruta mediada por β-catenina se inicia mediante la unión de la proteína Wnt al complejo de receptores miembros de la familia frizzled (Fzd), lipoproteínas de baja densidad (LRP5 y LRP6) y correceptoras LRP, los cuales inhiben a la proteína citoplasmática glucógeno sintasa quinasa 3-β (GSK-3). En ausencia de Wnt, β-catenina es fosforilada por GSK-3 en el “complejo de destrucción” mediada por Axin y APC, y finalmente es degradada. Cuando Wnt está presente, la β-catenina evade la fosforilación y por lo tanto su degradación, acumulándose en el citoplasma. El exceso de β-catenina provoca que entre al núcleo donde se asocia a factores de transcripción asociados a linfocitos T que activan la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular [179,180] (**Figura 6**).

La señalización Wnt/ β-catenina es una ruta biológica conservada en la formación OH. En la OH intramembranosa, los niveles de Wnt se incrementan durante la condensación de las MSCs lo que inhibe la diferenciación de los condrocitos y promueve la diferenciación osteoblástica. Mientras que en la osificación endocondral, se mantienen niveles bajos de Wnt durante la condensación, para asegurar la diferenciación condrogénica, y finalmente sobre-expresarse en la periferia del cartílago donde los osteoblastos cercanos se diferenciaron [181,182]. Por otro lado se ha observado en modelos animales que la señalización Wnt/ β-

catenina regula el balance entre la osteogénesis y la adipogénesis, ya que al activarse Wnt se promueve la osteogénesis y en ausencia de β -catenina se activa la adipogénesis [183,184].

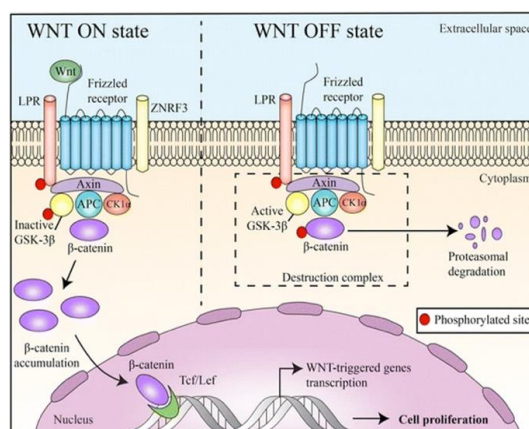


Figura 6. Activación e inactivación de la ruta Wnt/ β -catenina.

La activación de la ruta promueve la acumulación de β -catenina resultando en proliferación celular.

Mientras que la inactivación de la ruta produce la degradación proteasomal de β -catenina.

Con el permiso de Creative Common [179]

1.3.1.3.4 Ruta de señalización Hedgehog

La ruta de señalización Hh es crítica en el desarrollo embrionario y fundamental en la formación ósea [185]. Su activación depende de tres proteínas funcionales altamente expresadas y secretadas por MSCs: i) *Desert Hedgehog*, su expresión es exclusiva en el sistema reproductor masculino; ii) *Indian Hedgehog*, reguladora de la condrogénesis y la osificación de tipo endocondral y iii) *Sonic Hedgehog*, determinante en el *commitment* celular, y la diferenciación a osteoblastos [186–189].

Las proteínas Hh secretadas se unen a 12 dominios transmembranales del receptor Patched 1 (PTCH1) esta unión inactiva al inhibidor de Hh, Smoothed (SMO) cambiando su localización subcelular. SMO es fosforilado por la proteinasa K (PKA) y la caseína I (CKI) lo que resulta en la acumulación de SMO en la superficie celular y la actividad de la ruta Hh [190,191] (**Figura 7**). La ruta Hh promueve la activación del factor de transcripción GLI el cual tiene propiedades pro-osteogénicas y anti-adipogénicas en MSCs [188,192,193].

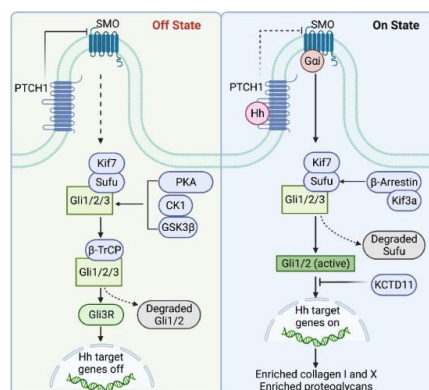


Figura 7. Activación e inactivación de la vía Hedgehog (Hh)

Con el permiso de Elsevier [193]

1.3.1.3.5 Ruta de señalización mTOR

La ruta de señalización PI3K/Akt/mTOR es una ruta muy conservada que promueve la progresión del ciclo celular, la supervivencia y crecimiento celular. En el contexto de la regulación osteogénica, se ha observado la implicación de mTOR en el control del

commitment y diferenciación de MSCs a osteoblastos [194,195] (**Figura 8**). mTOR está constituido por dos complejos multiprotéicos mTORC1 y mTORC2, los cuales se diferencian por su complejo regulador *raptor* (*regulatory-associated protein to mTOR*) y rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) respectivamente [196]. Por otro lado mTOR tiene funciones regulatorias en la adipogénesis y en el almacenamiento de lípidos, ya que está implicado en el *commitment* precursor adipogénicos, diferenciación de pre adipocitos a adipocitos maduros así como en la síntesis y movilización de los adipocitos [197].

mTORC1 promueve procesos anabólicos como la traducción de mRNA y la síntesis de proteínas y lípidos, activándose por factores extracelulares que controlan el desarrollo del tejido óseo, como pueden ser factores de crecimiento y hormonas; mientras que situaciones de baja energía e hipoxia funcionan como reguladores negativos de la ruta. La activación de mTORC1 inicia con la unión de los reguladores positivos a los receptores RTK/GPCR quienes activan en cascada a PI3K/PDK1/Akt, este último inhibe al complejo TSC1/TSC2/TBC1D7 y estos a Rheb quien fosforila a mTORC activándolo. La inhibición de la ruta se produce por la activación de AMPK por reguladores negativos [198–200].

La regulación de mTORC1 en la formación de OH se produce por dos vías, por el factor de crecimiento IGF-1 (Factor de Crecimiento Insulínico) presente en la matriz ósea y liberada durante la absorción ósea, la cual estimula la diferenciación de MSCs a osteoblastos. Y por vía mecano-sensor activando la Sirtuir1 (Sirt1) en el núcleo celular quien reprime la expresión de esclerostina, un potente regulador negativo de la diferenciación osteoblástica y la formación de hueso[201–203]

Por su parte, mTORC2 regula la proliferación, supervivencia y metabolismo celular mediante la fosforilación de Akt el cual activa a mTORC1 por inhibición del complejo TSC1/TSC2/TBC1D7 [204]. Además mTORC2 se identifica como un mediador de señales mecánicas y bioquímicas que estimulan la diferenciación osteoblástica e indirectamente promueven la osteoclastogénesis regulando la expresión de RANKL [205]. Se ha observado que su interacción con la señalización Hedgehog (Hh-Gli2) vía mTORC2-Akt-Gli2 sobreestimula la ruta Hh y la osteogénesis [198,206].

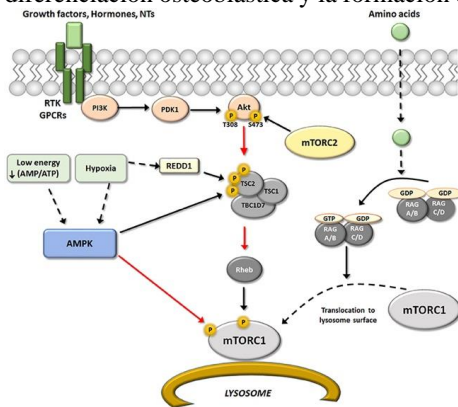


Figura 8. Reguladores de la ruta de señalización mTOR. Con permiso de Creative Commons [195]

1.3.1.3.6 Ruta de señalización Notch

Notch es una ruta de señalización conservada, implicada en la osteogénesis y adipogénesis. Esta ruta cuenta con cuatro receptores Notch (Notch1-4); y cinco ligandos, dos Jagged/Serrate (Jag1, Jag2) y tres de la subfamilia Delta (Dll1, Dll3 y Dll4). Tanto los receptores como los ligandos son proteínas transmembranales que requieren comunicación célula-célula para regular diferentes procesos de diferenciación [118,207–210]

Una vez activado Notch, induce la unión proteolítica y liberación del dominio intracelular de Notch (NICD, por sus siglas en inglés). NICD viaja al núcleo, se une a una proteína de unión al ADN y activa factores de transcripción de genes como *HES-1* y *Hey-1* resultando en la activación de procesos de proliferación y diferenciación celular [118,211,212]. Además, juega

un papel importante en procesos de diferenciación y de segmentación durante la embriogénesis [213].

Por otro lado, en la osteogénesis, la ruta Notch controla el mantenimiento y la diferenciación de las MSCs previniendo la diferenciación osteoblástica prematura, y por otro lado, inhibe la diferenciación osteoclastica, pero aumenta su maduración y función [214,215]. Se ha sugerido que la ruta Notch inhibe la adipogénesis además de ser un regulador negativo de la proliferación de células endoteliales y crecimiento vascular [216–218].

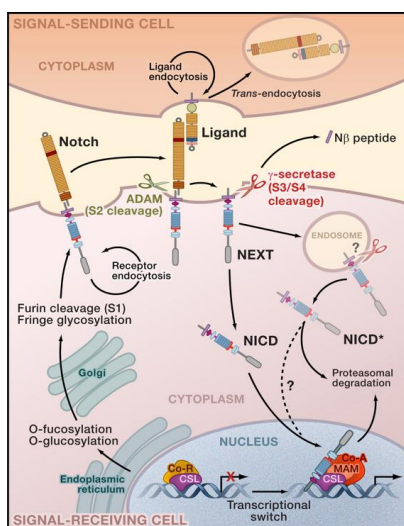


Figura 9. Ruta de señalización Notch
Con permiso de Elsevier [210]

1.3.2 Osificaciones heterotópicas

Las OH aparecen a las primeras semanas de vida como pequeñas pápulas en las capas profundas de la piel (osteomas en forma de capa) con cambio en la pigmentación de la piel afectada y anormalmente áspera al tacto. Estas placas pueden tener proyecciones afiladas de osificación (espículas), que pueden atravesar a la superficie de la piel causando irritación e infección superficial. La maduración gradual de la osificación desencadena su progresión a tejidos conectivos donde se alojan células estromales con potencial osteogénico, formando placas óseas que eventualmente se fusionan entre ellas y también al tejido óseo normal, dando como resultado anquilosis y retraso del crecimiento en las zonas afectadas [219,220].

La localización de la OH no tiene un patrón definido, sin embargo, usualmente presentan una distribución dermomiotal, predominando en la mayoría de los casos en una mitad del cuerpo e incluso en patrones de mosaico [54,82,221,222]. Esta distribución lateralizada sugiere que los tejidos afectados proceden de una población celular progenitora en común de origen mesodérmico y que se forman en línea horizontal, como son la dermis, el músculo y el hueso [222].

Histológicamente la OH en la HOP se observa dentro del estroma del tejido adiposo, lo que sugiere una diferenciación anormal de MSCs y/o precursores celulares que dan lugar a células osteoblásticas y adipocíticas [54,69,219].

1.3.2.1 Formación y tipos de OH

La OH se produce por la desregulación de dos procesos fisiológicamente naturales de osteogénesis (formación de hueso), y la osificación intramembranosa o endocondral, ambos de origen mesodérmico en los cuales el tejido conectivo es remplazado por hueso [118,223].

Las células funcionales del proceso de osificación son: i) células osteocondroprogenitoras, que se refiere a MSCs que pueden diferenciarse a condrocitos, mediante la regulación de los factores de transcripción SOX9, L-SOX5 y OSX6; y a osteoblastos, regulado por Runx2/CBFA1 y osterix (OSX)[224,225]. ii) osteoblastos, células de origen mesenquimal efectoras de la formación ósea y cruciales en la remodelación ósea; inducen su propia diferenciación mediante la secreción de ligando RANK (RANKL), el cual se unirá al receptor RANK de los pre-osteoblastos, y previenen la diferenciación de osteoclastos por la secreción de osteoprotegerinas (OPG) que se une a RANKL bloqueando la unión RANK-RANKL, por lo que el balance entre RANKL/OPG determina la actividad osteoclástica [226,227]. iii) los osteoclastos, que son células multinucleadas derivadas de macrófagos que realizan la función de reabsorción ósea, llegando al hueso a través de los vasos sanguíneos [228,229]. Y iv) osteocitos, que son las células más abundantes en el hueso. Es el principal sensor de carga mecánica del hueso, comunicándose entre ellas mediante procesos citoplasmáticos, lo que les permite detectar estrés y ser determinantes en el remodelamiento óseo [230].

En pacientes con HOP se ha reportado que un 50% de las osificaciones son de tipo intramembranosa, 20% de tipo endocondral y el 30% restante una mezcla de ambos tipos, sin presentar en ningún caso componentes inflamatorios [54,55].

1.3.2.2 Formación de osificación intramembranosa.

Durante el proceso de osificación intramembranosa las células progenitoras MSCs proliferan y se condensan formando una pequeña zona no vascularizada, donde las células son inducidas a diferenciarse a osteoblastos por la acción de proteínas BMP. Las BMP sobre regulan la expresión del factor de transcripción Runx2 y activan genes como la Osteocalcina (OC), osteopontina (OPN), osteoprotegerina (OPG) y otras proteínas de matriz extracelular ósea [231]. En este punto, pequeños capilares se mueven hacia la zona avascular e invaden la condensación cercana al núcleo de la osificación.

Los osteoblastos secretan colágeno-proteoglicano tipo I el cual se une al calcio formando la matriz pre-ósea (osteoide) que acompañado de una invasión vascular, produce la mineralización [232–234]. Algunos osteoblastos se quedan atrapados en la ECM mineralizada y se convierten en osteocitos, que son las células somáticas del hueso. La matriz mineralizada y altamente vascularizada está rodeada de una membrana alrededor del hueso llamada periostio, donde hay MSCs las cuales eventualmente se convierten en osteoblastos creando así las capas constitutivas del hueso [235,236] (*Figura 10*).

1.3.2.3 Formación de osificación endocondral

La osificación endocondral es un proceso complejo que involucra la diferenciación de las MSCs a cartílago y éste subsecuentemente es remplazado por tejido óseo. En una primera etapa las MSCs son inducidas a condensarse y diferenciarse a células cartilaginosas (condrocitos) por la sobre regulación del gen *SOX9* mediante la acción de citoquinas como TGF- β y BMP-2 [237,238]. En la zona condensada, los condrocitos son estimulados por la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) para su proliferación continua y secreción de colágeno tipo II que crea la matriz del cartílago.

La proliferación condrocítica es delimitada por la acción de citoquinas como la FGF, dando lugar a su hipertrofia y subsecuente mineralización del modelo de cartílago [239,240]. En una última etapa, las células de tejido conectivo alrededor del cartílago (pericondrio) se diferencian a osteoblastos que mineralizan y forman el hueso cortical, el cual es invadido por vasos sanguíneos y progenitores osteoblásticos y osteoclasticos que crean el centro de la osificación primaria, donde el cartílago erosiona y es remplazado por médula ósea y hueso trabecular. Se crean osificaciones secundarias en cada extremo del cartílago y el crecimiento de las osificaciones primarias y secundarias permiten el crecimiento óseo longitudinal [241] (**Figura 10**).

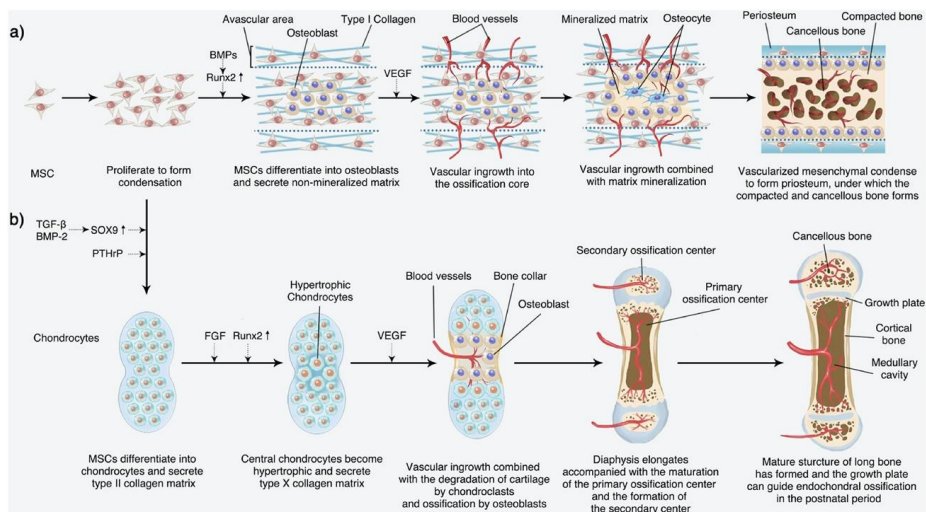


Figura 10. Tipos de osificación durante el desarrollo embrionario.

a) Osificación intramembranosa. Diferenciación de MSC a osteoblastos; b) Osificación endocondral, implica la diferenciación de MSC a condrocitos la hipertrofia de estos y la consecutiva diferenciación osteoblástica. Con permiso de Creative Common [234]

Aunque la diferenciación celular en la formación de la OH no se ha estudiado a profundidad, estudios recientes sugieren que en éste proceso participan una gran variedad de células que tienen potencial de cambiar su destino diferencial a células osteogénicas en respuesta a estímulos que promueve la formación de OH [242].

1.3.2.4 Factores asociados a la formación de OH

La inflamación y la hipoxia son importantes alteraciones del microambiente que pueden estimular el desarrollo de OH. Cuando existe una lesión o trauma, se desencadena una inflamación sistémica que resulta en el incremento de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés), interleucinas (IL-1 β , y IL-6) y la citoquina quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) las cuales pueden causar una activación anormal de las MSCs en tejidos blandos diferenciándose con destino celular (*commitment*) fibroblástico hacia células osteogénicas, iniciando la formación de OH. Por otro lado, células asociadas a inflamación como son los macrófagos y mastocitos se acumulan en las zonas lesionadas y promueven la OH [243,244].

Después de una lesión o trauma, el estado de hipoxia del tejido puede iniciar la formación de OH mediante la activación de factores inducibles de hipoxia, los cuales incrementan la

producción de citoquinas pro angiogénicas como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) lo cual facilita la formación de hueso heterotópico [219,245,246]. Se ha sugerido la inhibición de los factores inducibles de hipoxia como terapia frente a la OH [247].

1.3.2.5 Interacción osteo-inmune en la formación de OH

La osteoinmunidad se refiere a la relación existente entre el sistema inmunitario y el metabolismo óseo y su intervención en la reparación de tejidos y cicatrización [248]. Además, se ha determinado su contribución en el desarrollo de OH mediante la función de tres componentes inmunológicos: el sistema complemento, los macrófagos y los mastocitos [249].

El sistema complemento es una ruta de señalización que tiene como función la opsonización de patógenos mediante la sobre-regulación de citoquinas y quimiocinas que producen la quimiotaxis de macrófagos y neutrófilos [250]. Recientemente se ha descrito en la reparación y regeneración de tejido óseo, ya que los factores C3a y C5a modulan la osteoclastogénesis y la respuesta de los osteoblastos a la inflamación [251,252]. Los precursores de macrófagos activan la osteoclastogénesis en respuesta a citoquinas, como el ligando receptor activador nuclear kappa (RANKL, por sus siglas en inglés), por otro lado los macrófagos producen BMP2 activando señales osteo-inductivas y secretan diversas citoquinas inductoras de OH como la IL6, Il-10, la proteína MCP-1 [253,254].

Los mastocitos son células hematopoyéticas que residen en tejidos vascularizados y están involucrados en procesos de reparación de tejidos, cicatrización, fibrogénesis y angiogénesis, y en la formación de OH [255,256]. La inmunidad adaptativa también ha demostrado promover la formación de OH ya que la ausencia de linfocitos T y B atenúan la respuesta osteogénica [257–259]

El TNF- α , el TGF- β , Interferón gamma, MCP-1 y la IL-6 son productos inmunológicos que promueven la osteogénesis y mineralización mediante la inducción de BMP2 [260,261].

1.4 TRATAMIENTOS

Se han dirigido terapias farmacológicas a rutas de señalización, factores de transcripción y mediadores inmunológicos involucrados en la formación de OH como medidas profilácticas.

Se ha observado que el uso de anti-inflmatorios no esteroideos (AINES) como la indometacina previenen la formación de OH mediante la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) quien produce la disminución de prostaglandinas que son fuertes inductores de la formación ósea [262].

Los bifosfonatos son compuestos inorgánicos resistentes a la actividad enzimática y que tienen la capacidad de inhibir precipitados de fosfatos de calcio previniendo la formación de OH mediante el arresto de la mineralización del osteoide [263].

El uso de glucocorticoides disminuye la actividad osteogénica incrementando la expresión de antagonistas de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina como es la esclerostina y la proteína 1 relacionada con Dickkopf 1 (DKK1, por sus siglas en inglés) [264].

La radioterapia inhibe la osteogénesis y previene tanto la reparación como el crecimiento anormal del tejido óseo. Se ha demostrado la prevención de las OH en un 83 % de veces que se aplicó ciclos de radioterapia antes de procedimientos quirúrgicos y un 17 % de las veces en las que se aplicó después de las cirugías. Además se ha recomendado la administración combinada de AINES y radioterapia para obtener mayor efectividad frente a la formación de hueso heterotópico [265].

Algunos inhibidores como i) rampamicina que inhibe la ruta de señalización mTOR [266]; ii) Vismodegib inhibidor de la ruta Hh [267]; iii) Esclerostina (SOST) proteína inhibidora de la

ruta Wnt [268]; se han sugerido como nuevas dianas terapéuticas frente a enfermedades osificantes como es la HOP [269].

1.5 PROGRESIÓN Y PRONÓSTICO DE HOP

Siendo una enfermedad ultra rara la información del pronóstico es muy limitada.

La progresión de la enfermedad es muy variable entre los pacientes que la presentan, puede ir desde una evolución extremadamente lenta o casi estacionaria a una progresión severa y rápida. En la mayoría de los casos reportados se ha descrito una progresión gradual que se ve frenada en la etapa adulta en donde la generalmente disminuye [54].

1.6 BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES

Los estudios “ómicos” implican el uso de distintos enfoques de una misma condición, generalmente se refiere al uso de la genómica, epigenómica, transcriptómica y proteómica; que, con los avances de la biología computacional, ofrecen la posibilidad de generar, analizar e interpretar una enorme cantidad de datos y aplicarlos en ámbitos clínicos como el diagnóstico o el desarrollo de terapias dirigidas.

Los estudios “ómicos” se han utilizado para la búsqueda de biomarcadores de enfermedades, que tienen el potencial de ser valiosos desde el punto de vista médico en todas las etapas del proceso de la enfermedad, desde el diagnóstico, la identificación de los subtipos de la enfermedad y el pronóstico hasta el ajuste terapéutico.

Además, la posibilidad de hacer un análisis multi-ómico integrado aumenta aún más el rendimiento del diagnóstico y puede ayudar a explicar la heterogeneidad genotípica y fenotípica de una enfermedad [270]

1.6.1 Epigenética.

La epigenética se refiere a todos los cambios heredados en la expresión de genes que no están codificados en la secuencia de ADN y forman un mecanismo, por el cual, los eventos ambientales pueden codificarse y modificar las respuestas celulares futuras. Los mecanismos epigenéticos tienen efectos represores/inhibidores y permisivos sobre la expresión génica y, por lo tanto, desempeñan un papel clave en la diferenciación celular, activando/reprimiendo diferentes conjuntos de genes. Los patrones epigenéticos difieren entre los individuos y cambian con el tiempo, influenciados por factores ambientales intrauterinos y posnatales, así como la nutrición, las toxinas o las drogas y las enfermedades [271,272].

La discordancia fenotípica entre gemelos monocoriónicos se ha atribuido a los cambios epigenéticos. La condición gemelar monocoriónica ocurre durante el inicio del desarrollo embrionario, siendo también el momento con mayor reprogramación epigenética. Inmediatamente después de la fertilización y antes de implantarse, el embrión sufre ciclos de desmetilación global del ADN, seguido de una metilación de *novo* mientras las células pluripotentes determinan su *commitment* celular [273,274]. Se ha reportado que gemelos monocoriónicos mantienen una estabilidad en los patrones de metilación de ADN en tejidos adultos somáticos, dichas marcas epigenéticas se localizan en genes involucrados en el *commitment* y adhesión celular, así como en la ruta Wnt. Dichas marcas epigenéticas no se encontraron en genes sujetos a *imprinting*, a pesar de la relación existente entre la condición gemelar monocoriónica y los síndromes de *imprinting* [275].

Uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados es la metilación del ADN, un fenómeno que involucra la adición de un grupo metilo (CH₃) al carbono 5 de una citosina que da como resultado 5-metilcitosina (5-mC). Si bien la metilación puede ocurrir en varias regiones

del genoma afectando la expresión génica, la presencia de una CpG en la región promotora puede afectar la expresión del gen resultando en la represión de su expresión [276,277].

1.6.2 Transcriptómica

El transcriptoma colecta toda la información génica que se está expresando en las células y tejidos bajo ciertas condiciones biológicas. Nos permite entender la plasticidad del genoma, así como el funcionamiento y regulación de los genes siendo clave en la regulación de los procesos biológicos y determinante en las enfermedades [98].

Los análisis transcriptómicos han revelado que más del 93% del genoma humano se transcribe en ARN, solo el 2% en mRNA y el resto consiste en ncARN (no codificante) [99].

Los miARN son un tipo de ncARN que regulan la expresión génica post-transcripcional y que tienen la capacidad de inhibir la expresión génica, inhibiendo o degradando a los mRNA. Su capacidad regulatoria puede ser combinada ya que un solo miARN puede regular diversos genes y un solo gen puede ser diana de múltiples miARNs [100], por lo que su identificación en un contexto patológico contribuiría a su prevención, diagnóstico pronóstico y posible tratamiento [101].

Los miARN son moléculas que ejercen un rol regulatorio en diversos procesos biológicos. Se han identificados diversos miARNs involucrados en la regulación del *commitment* y diferenciación de las MSCs, como son: i) miR-211 identificado en *Runx2* suprime la osteogénesis y promueve la adipogénesis [278]; ii) miR-637 regula positivamente la adipogénesis inhibiendo la osteogénesis por su localización en el gen *Osterix* [279]; iii) miR-27b suprime a *PPAR γ* y *C/EBP α* teniendo efecto anti-adipogénico [280]; iv) se ha sugerido la regulación negativa del miR-21 en la ruta TGF- β , ya que se ha observado la sobre expresión de éste miARN después de la adipogénesis teniendo así un rol negativo en la osteogénesis [281]; v) miR-30 regula negativamente a BMP-2 e induce la diferenciación osteogénica mediante sus dianas *Smad1* y *Runx2* [282,283]; vi) miR-322 aumenta la respuesta de BMP por su diana *Tog* [284] y vii) miR-140 regula positivamente a BMP y promueve la condrogénesis [285].

Otros miARNs han demostrado tener un efecto paralelo en la adipo-osteogénesis, por ejemplo, miR335 se presenta disminuido durante la osteogénesis sin embargo su sobreexpresión inhibe tanto la adipogénesis como la osteogénesis por su localización en *Runx2* [286,287].

1.6.3 Proteómica

La proteómica es una herramienta incluida dentro de las “ómicas” dedicada a la identificación de las moléculas funcionales (proteínas), su localización, su interacción con otras proteínas y sus modificaciones en determinadas condiciones biológicas.

El análisis de proteínas en fluidos como suero sanguíneo, orina e incluso lágrimas, permite el descubrimiento de biomarcadores, además el mapeo del perfil proteico y sus interacciones en el contexto patológico, lo cual facilita el desarrollo de terapias dirigidas [288–290].

A pesar de ser una herramienta reciente a comparación de la genómica o transcriptómica, el desarrollo en tecnologías de identificación y cuantificación de proteínas (espectrometría de masas, MS) ha aumentado la sensibilidad y el rendimiento en la identificación de proteínas, incluso las de menor abundancia, utilizando variedad de muestras y tejidos. Así mismo la implementación de ésta tecnología posibilita mejorar el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las enfermedades incluso las de naturaleza rara [291–293].

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La Heteroplasia Ósea Progresiva (HOP) fue descrita por primera vez en 1994. Según los datos recopilados por distintas organizaciones dedicadas al estudio de las enfermedades raras, en los primeros 10 años se describieron únicamente 40 casos en el mundo. En el año 2020 se reportaron un total de 50 pacientes diagnosticados con HOP. Se trata, por lo tanto, de una enfermedad ultra-rara y como tal, existe información limitada a cerca de su fisiopatología que permita entender, tratar o controlar la enfermedad. La investigación en este tipo de enfermedades se centra en obtener la mayor información posible de los mecanismos biológicos que intervienen en, no sólo las causas, sino en la evolución y progresión de la enfermedad. En segundo lugar, la investigación de las enfermedades raras busca utilizar parte de este conocimiento adquirido para identificar posibles estrategias de tratamiento, enfocándose principalmente en las pruebas preclínicas. Y el fin último, busca llegar a la traslación de este conocimiento a la atención del paciente.

Este estudio busca sentar las bases clínicas, moleculares y celulares de este caso clínico que pone de manifiesto una evolución clínica totalmente discordante, que implica a una paciente con un progreso dramático de la enfermedad con graves secuelas y en progresivo deterioro, frente a su hermana gemela que presenta un patrón prácticamente asintomático, y siendo ambas portadoras de la misma mutación en el gen *GNAS*.

El objetivo principal de este proyecto es el estudio integral ómico, inmunológico y celular de la HOP en un caso internacionalmente único del que no existen antecedentes en la literatura científica y que involucra a dos hermanas gemelas con fenotipo discordante para la enfermedad.

Los objetivos específicos son:

- 1 Presentación del caso clínico. Descripción de un caso único de gemelas idénticas con diagnóstico genético de HOP y desarrollo clínico discordante, así como la presentación del esquema de terapias farmacológicas aplicadas en el caso de la gemela con el fenotipo más extremo.
- 2 Estudio inmunológico. Búsqueda de mecanismos subyacentes relacionados con la regulación inmunológica en el contexto de la osificación (osteoinmunidad) que predigan el curso de la enfermedad.
- 3 Estudio epigenómico. Análisis de los posibles mecanismos de regulación génica mediante el estudio de las diferencias en el patrón de metilación, que puedan intervenir tanto en el desarrollo de la enfermedad como en la manifestación del fenotipo diferencial que presentan ambas gemelas.
- 4 Estudio transcriptómico. Análisis del perfil de expresión génica para la búsqueda de genes candidatos y rutas metabólicas diana que puedan estar interviniendo en la formación de hueso ectópico o aquellos que puedan explicar el fenotipo desigual entre las hermanas gemelas.
- 5 Estudio proteómico. Identificación de proteínas asociadas a HOP y proteínas que puedan explicar las diferencias fenotípicas entre las hermanas gemelas que puedan servir como posibles marcadores de expresión proteómica aberrante. El perfil proteómico nos brinda una información valiosa sobre las proteínas expresadas diferencialmente durante la enfermedad que podrían utilizarse como marcadores diagnósticos o incluso posibles dianas terapéuticas.
- 6 Caracterización celular. Desarrollo de cultivos primarios a partir de tejidos de la paciente con HOP grave que nos proporcionará una herramienta fundamental para el

estudio y comprensión de los procesos de diferenciación celular que subyacen a la forma grave de la patología, así como el análisis de vías de señalización asociadas a HOP. El aislamiento, cultivo y criopreservación de estas células permitirá realizar estudios transcriptómicos *in vitro* durante la diferenciación celular, así como evaluar los cambios en dicha diferenciación durante su inducción con diferentes tratamientos farmacológicos y/o factores solubles. Asimismo, se estudiarán las distintas isoformas de *GNAS* en cultivos primarios de diferentes tejidos sanos, afectados y de controles, mediante estudios morfológicos y técnicas proteómicas semicuantitativas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo con código de registro: 2019/325 (*ANEXO I*).

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las Normas Tripartitas Armonizadas de la Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH, por sus siglas en inglés) para la Buena Práctica Clínica, con las regulaciones nacionales vigentes y con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki.

Se garantizó la confidencialidad de los datos de los sujetos participantes en el estudio, asegurándose el cumplimiento de la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y garantía de los derechos digitales y del Reglamento 2016/679 del Parlamento Europeo (UE) y del Consejo, de 27 de abril de 2016, de Protección de Datos (Reglamento General de Protección de Datos; RGPD).

Se obtuvo el consentimiento informado de los padres/tutores legales antes de realizar cualquier procedimiento relacionado con el estudio. Los padres/tutores legales recibieron del equipo investigador información sobre todos los aspectos relevantes del estudio para decidir si accedían a participar en el mismo o no, ofreciendo suficiente tiempo para leer la hoja de información y la oportunidad de formular cualquier pregunta que les pudiera surgir. En los formularios se hacía indicación también a que cuando los pacientes tuvieran edad suficiente (menor maduro) como para entender los objetivos y procedimientos del estudio, así como capacidad para decidir si querían participar en él o no, se obtendría el asentimiento informado del sujeto participante.

El tratamiento y manejo de las muestras biológicas obtenidas en el contexto del presente estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica.

3.2 SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LAS PACIENTES CON HOP

3.2.1 Diagnóstico genético para HOP*

El diagnóstico genético para HOP se realizó en la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, mediante tecnología de secuenciación, por el método de Sanger para la detección de mutaciones en el gen *GNAS*. Además, nuestro grupo de investigación corroboró la gemelaridad monocigótica de las pacientes mediante análisis masivo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) utilizando el chip de *Applied Biosystems Axiom Spain Biobank Array*, (Thermo Fisher Scientific) que incluye 715.195 SNPs del genoma completo de las gemelas. Usamos el sistema de análisis genético *Multi-Channel MC Instrument* (GeneTitan) para genotipar muestras de sangre y saliva de ambas pacientes, y una muestra de placa ósea de la Paciente 1.

Para inferir relaciones de parentesco basadas en la evidencia del genoma, seguimos los procedimientos descritos previamente por nuestro grupo [294,295], el genotipado se llevó a cabo en el nodo de Santiago de Compostela del Centro Nacional de Genotipado (CeGen). Se utilizaron 10 perfiles de genoma español aleatorios obtenidos del Proyecto 1000 genomas (IBS-

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monozygotic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

1000G) (codificados con el prefijo “HG”) como muestras de referencia para el cálculo de identidad por descendencia (IBD, por sus siglas en inglés).

3.2.2 Evaluación analítica de la progresión de la enfermedad*

Se analizaron los marcadores óseos en sangre periférica de ambas gemelas como parte de la evaluación inicial y, cuando los pediatras de nuestra consulta consideraron pertinente, en los seguimientos realizados a la Paciente1. Las muestras fueron enviadas y procesadas como parte del servicio asistencial del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS).

3.2.3 Análisis de marcadores de osteoinmunidad mediante ELISA multiplex

Para la medición simultánea de los marcadores séricos de osteoinmunidad y de recambio óseo se utilizó la tecnología *Luminex xMAP* que utiliza paneles de inmunoensayos con perlas magnéticas *MILLIPLEX MAP* (Millipore). Se analizaron muestras de las pacientes con HOP (Paciente1 y 2) y en suero de pacientes controles sin HOP.

El panel de marcadores de osteoinmunidad incluyó siete citoquinas: i) proteína quimioatrayente de monocitos (MCP.1/CCL2); ii) proteína inflamatoria de macrófagos (MIP.1/CCL4); iii) factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF.AA); iv) factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF.BB); v) factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α); vi) proteína 10 inducible por interferón gama (IP.10/CXCL10); y vii) ligando 5 de quimiocina (RANTES/CCL5).

El panel de marcadores de recambio óseo (BTMs, por sus siglas en inglés) incluyó 13 citoquinas: i) hormona adrenocorticotrópica (ACTHA); ii) *dickkopf-1* (DKK-1); iii) factor de crecimiento 23 (FGF-23); iv) IL-1 β ; v) IL-6; vi) insulina; vii) leptina; viii) osteocalcina (OC); ix) osteopontina (OPN); x) osteoprotegerina (OPG); xi) PTH; xii) esclerostina (SOST); y, xiii) TNF- α .

La cuantificación de las citoquinas se realizó en placas de 96 pocillos donde se agregaron 25 μ l de los sueros de los pacientes HOP y controles sin HOP. Se adicionaron 25 μ l de mezcla de perlas magnéticas embebidas con los anticuerpos de captura específicos. Se incubaron *overnight* a 4 °C. Se realizó un lavado a la placa y se adicionaron 50 μ l de una mezcla de anticuerpos biotinilados de detección. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se adicionaron 25 μ l de una solución de estreptavidina-ficoeritrina incubándose 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un lavado y las perlas se resuspendieron en 100 μ l de PBS (*buffer* fosfato salino, por sus siglas en inglés; Sigma Aldrich). La fluorescencia se midió utilizando la plataforma *Luminex-200 Instrument System* (Invitrogen). Los datos de fluorescencia se normalizaron mediante una curva estándar utilizando el software *Xponent 3.1* (Luminex).

Se ha considerado el contraste de Wilcoxon para evaluar la existencia de diferencias entre los distintos perfiles séricos de citoquinas del grupo HOP (promediado las pacientes) contra el grupo control utilizando los datos normalizados. El nivel de significancia se fijó a 0,05. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el *software R* [296].

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monozygotic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

3.2.4 Diseño del protocolo farmacológico*

Debido a la rápida progresión de la enfermedad y el riesgo de incapacidad permanente de la Paciente1, se hizo una revisión bibliográfica de opciones terapéuticas y se diseñó un protocolo de tratamiento, en el cual se consideraban las evidencias del tratamiento en procesos de osificación heterotópica contra la severidad de los posibles efectos adversos y el impacto de la progresión de la enfermedad en las actividades normales de la paciente (*Figura 11*). Las intervenciones fueron aplicadas exclusivamente a la Paciente1 siendo la más gravemente afectada, ya que la Paciente2 permaneció sin progresión de la enfermedad.

En un primer paso, se administró la hormona factor de crecimiento similar a la insulina humana recombinante-1 (rhIGF-1, por sus siglas en inglés) para regular los niveles persistentemente bajos que presentó desde su nacimiento la Paciente1. Y el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) para el alivio del dolor relacionado con la sintomatología.

Todos los tratamientos incluidos en nuestro protocolo fueron aprobados como medicamentos de uso compasivo por todos los servicios médicos implicados en la atención de la Paciente1, (Pediatria, Neonatología, Endocrinología, Gastroenterología, Neurología, Cirugía Pediátrica, Dermatología, Unidad de Pacientes Crónicos, Traumatología, Rehabilitación y Fisioterapia, Farmacia y Laboratorio).

Se realizaron extracciones de sangre antes, durante y a la finalización del tratamiento y, siempre que fuera necesario se realizaron exéresis de placas de osificación. Se almacenaron los tejidos mesenquimatosos osificados y circundantes para análisis moleculares y establecimiento de cultivos celulares.

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monochorionic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

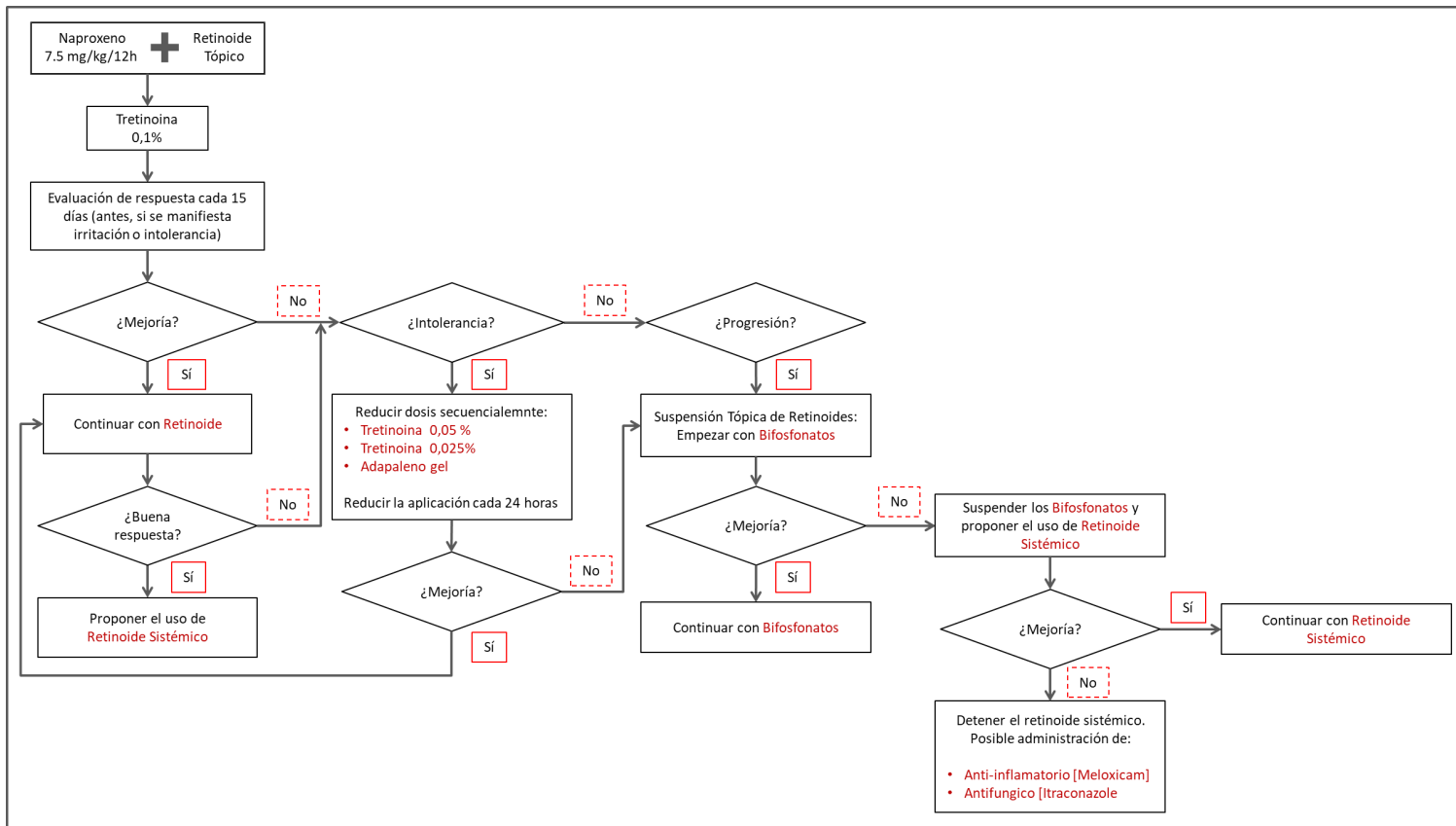


Figura 11. Diagrama de flujo original de opciones terapéuticas después de la administración de IGF-1 para la Paciente1 [352]. Con permiso de: Creative Commons Attribution License.

3.2.5 Evaluación del efecto del protocolo farmacológico sobre la enfermedad

El éxito del protocolo farmacológico se evaluó midiendo los niveles de los BTMs: propéptido N-terminal del colágeno tipo I (PINP, por sus siglas en inglés) y telopéptido-C terminal tipo I o β -Crosslaps (CTX), para ello se realizaron extracciones de muestras sanguíneas antes de iniciar un nuevo tratamiento, quincenalmente durante la terapia y después de retirarla. Los brotes de la enfermedad se definieron como periodos de astenia y dolor muscular que se prolongó durante cinco días o más acompañado de evidencia en la progresión y/o formación de osificaciones.

3.2.6 Evaluación del Everolimus como tratamiento para HOP

La Paciente1 se trató con Everolimus como opción de tratamiento compasivo debido a la progresión severa de la enfermedad.

Durante el tratamiento se realizó una cuantificación de los BTMs y los marcadores relacionados con el metabolismo óseo. Las mediciones se realizaron en suero de la paciente en diferentes puntos temporales durante la administración del Everolimus: a los 2, 4, 9, 16, 30, 44, 93, 100, 114, 143, 199, 212, 233 y 254 días después del comienzo del tratamiento.

El análisis cuantitativo de los BTMs se realizó en el Servicio de Inmunología del CHUS utilizando el sistema de análisis de inmunoensayo automatizado *ADVIA Centaur XPT* (SIEMENS Healthineers), un método de alta especificidad y afinidad en la detección de anticuerpos dianas.

Se estudiaron los BTMs: fosfatasa alcalina (ALP, por sus siglas en inglés), CTX y PINP; así como el control periódico de los niveles de Everolimus en sangre.

Los datos se analizaron utilizando el coeficiente de correlación de Pearson para evaluar el efecto del tratamiento Everolimus sobre los diferentes marcadores. El nivel de significancia considerado fue 0,05 y se utilizó la corrección de Bonferroni para el ajuste de comparaciones múltiples. Los análisis se realizaron con el software estadístico R [296].

3.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LOS ESTUDIOS ÓMICOS Y CELULARES

La colección de muestras que se analizaron en este trabajo incluye sangre y varios tejidos sólidos. La sangre fue obtenida en consultas de revisión, en el caso de los controles; y en consultas de seguimiento de la enfermedad y/o prequirúrgicas, para las pacientes con HOP en diferentes etapas de la enfermedad.

En los tejidos analizados se incluyeron: i) osificaciones heterotópicas de diferentes zonas afectadas de la gemela con progresión severa (Paciente1); ii) tejido sano (piel, hueso y grasa) obtenido de la amputación del miembro inferior más afectado de la misma paciente; iii) piel de controles sin HOP obtenidas de circuncisiones programadas; y, iv) hueso de controles sin HOP, obtenidas de amputaciones de extremidades inferiores por infección o lesiones irreparables que no incluyen osificaciones heterotópicas ni enfermedades óseas.

Se recopilaron los datos clínicos como son síntomas, imágenes de lesiones, osificaciones, secuelas de la progresión de la enfermedad, tratamientos médicos y/o quirúrgicos.

Las muestras se recolectaron y almacenaron dependiendo del tipo de análisis que se realizaría con cada una de ellas (*Tabla 3*). Estas muestras forman parte de la colección privada de muestras biológicas “Línea de Investigación e Inmunización en Pediatría” (código de registro nacional de biobancos: C.0003280) cuyo responsable clínico es el Dr. Federico Martínón Torres, codirector del presente proyecto de tesis. Para la selección de controles se consideró el *background* poblacional. Tras el análisis de las muestras, y siempre que los padres/tutores legales (participante, si aplica) hubieran accedido a ello en el documento de consentimiento informado, las muestras remanentes se conservarán durante 20 años.

Tabla 3. Colección de muestras analizadas

Tipo de muestra	Colección	Análisis	Almacenamiento
Sangre	Tubo BD Vacutainer con anticoagulante EDTA	Epigenética	Congelación -80 °C
	Tubo BD PAXgene	Transcriptómica: - RNaseq - n-Counter	Congelación -80 °C
	Tubo BD Vacutainer SST geles separados	Proteómica Osteoinmunidad Ensayos Funcionales <i>in vitro</i>	Centrifugación 2000 rfc/10min Congelación -80 °C
Tejidos	RNAlater	Transcriptómica	Congelación -80 °C
	Sin preservantes	Epigenética	Congelación -80 °C
	Medio de cultivo DMEM	Cultivos primarios	Procesamiento inmediato

3.4 ANÁLISIS EPIGENÉTICOS DE HOP A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

Los análisis epigenéticos se realizaron en la plataforma de apoyo común de Epigenética del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). Los análisis epigenéticos permitieron determinar patrones individuales que pudieran ser esenciales en procesos como la diferenciación celular embrionaria, la inactivación del cromosoma X y la impronta genética dependiente del origen parental, posible elemento clave en la determinación de los fenotipos en la HOP [297].

En este trabajo se realizaron análisis epigenómicos utilizando muestras de sangre periférica de las pacientes con HOP y de controles sanos (*Tabla 3*).

3.4.1 Extracción y cuantificación de ADN

La obtención de ADN genómico a partir de muestras de sangre completa (*Tabla 3*) se realizó mediante aislamiento y purificación utilizando columnas de sílice (*QIAamp DNA mini kit*, QIAGEN) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Todos los ADN aislados y purificados se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop ONE Microvolume* (Thermo Scientific).

3.4.2 Estudio de asociación del epigenoma completo

El análisis del estado global de metilación del ADN en pacientes con HOP se realizó mediante el estudio de asociación del epigenoma completo (EWAS, por sus siglas en inglés) en muestras de sangre periférica de las pacientes con HOP.

Se utilizó el *microarray Infinium MethylationEPIC BeadChip* (Illumina) el cual incluye más de 850.000 sitios CpG que cubren regiones genómicas reguladoras, potenciadores que abarcan sitios de unión de factores de transcripción y regiones de cromatina abierta [298].

Para estudiar la metilación que existía en los sitios CpG en todo el genoma se sometió al ADN genómico a un tratamiento con bisulfitos, provocando que los residuos de las citosinas no metiladas en los sitios CpG se desaminaron a uracilos, mientras que las citosinas metiladas se quedaron intactas. Se realizó una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y los uracilos se amplificaron como timinas y las citosinas metiladas quedaron como citosinas. El producto de la amplificación de la PCR se hibridó con el *Illumina Infinium Methylation BeadChip* (Illumina). Se realizó una extensión y tinción de los *BeadChip*. Y finalmente, el sistema *iScan* (Illumina) midió la intensidad de la señal e hizo una captura por matrices con la cuantificación del porcentaje de metilación que hubo en cada sitio CpG.

3.4.3 Análisis de datos EWAS

Los datos crudos de metilación (archivos /.idat) se analizan utilizando el paquete de R *Minfi* [299]. Los valores de metilación de cada sitio del genoma se registraron como valor Beta o valores M; este valor se estimó a partir de la relación de intensidad de señal metilada sobre la señal total (metilada y no metilada) de cada posición genómica. Un valor $\beta = 0$ correspondería a una muestra que todas las copias del sitio CpG están sin metilar; y un valor $\beta = 1$ correspondería a una muestra en la que todas las copias del sitio CpG están metiladas. El valor M corresponde a un modelo *Logit* del valor β .

Se realizó un control de calidad que consiste en: i) filtrado de muestras y sondas; ii) corrección del *background*; iii) ajuste del *bias* de tipo I y tipo II; iv) corrección del efecto de lote; y v) corrección por composición celular.

Una vez superado el control de calidad, los datos fueron normalizados y se identificaron las posiciones diferencialmente metiladas (DMP, por sus siglas en inglés) utilizando el paquete *limma* [300], se aplicó un modelo lineal ajustado por edad y composición celular. Los DMP obtenidos fueron filtrados por umbral de significancia (P-valor <0,05 corregido por método de Benjamini-Hochberg).

Se identificaron las regiones diferencialmente metiladas en las que múltiples citosinas cercanas presentaron el mismo patrón de metilación.

La visualización global de los patrones de metilación entre pacientes con POH y controles se realizó mediante el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) utilizando los paquetes *FactoMineR* [301] y *factoextra* [302]. De esta forma se comprobaron los patrones de metilación diferenciales entre muestras y se identificaron posibles valores atípicos.

La evaluación de la relevancia funcional de las regiones y DMP se realizó mediante el análisis de enriquecimiento en términos GO, utilizando el paquete *methyIISA* [303]. Este análisis permitió asignar a los genes patrones de metilación ajustando por el número de CpG en lugar de por la longitud del gen.

3.5 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICOS DE HOP MEDIANTE TECNOLOGÍA N-COUNTER

El análisis transcriptómico con tecnología n-Counter se realizó en nuestra Unidad de Detección Molecular Digital Directa (Nanostring), una plataforma de apoyo común del IDIS. La tecnología patentada de detección molecular digital directa que Nanostring utiliza en su sistema n-Counter *multiplex* (expresión de hasta 800 genes simultáneamente), mide solamente la cantidad real de moléculas diana presentes en la muestra. Es una tecnología única de alta precisión, sensibilidad y reproducibilidad. Los niveles de precisión y sensibilidad se mantienen incluso con niveles bajos de expresión. Todo esto lo consigue sin necesidad de llevar a cabo ninguna reacción enzimática previa (no requiere PCR, ni PCR con transcriptasa inversa [RT-PCR]), lo cual reduce al mínimo la probabilidad de aparición de un falso positivo y de sesgos en nuestros resultados.

Al no requerir enzimas, el sistema puede trabajar con una gran variedad de tipos y calidades de muestras, siendo posible incluso obtener resultados óptimos donde el material de partida está muy degradado. Esta tecnología es capaz de trabajar con lisados celulares crudos, facilitando el manejo de las muestras y ahorrando pasos de laboratorio a la hora de trabajar con RNA.

Se utilizaron, tanto paneles comerciales, como diseñados a medida. En estos últimos se incluyeron 23 genes implicados en rutas relacionadas con el metabolismo óseo y la diferenciación celular (*Tabla 4*). Los paneles comerciales utilizados fueron el *PanCancer IO 360 Panel* (nanoString), que incluye 770 genes involucrados en vías de señalización Notch, Wnt, Hh, modificación de cromatina, regulación transcripcional, control al daño de ADN, *TGF-*

β , MAPK, STAT, PI3K, RAS, ciclo celular y apoptosis; y el panel de miARNs *Human v3 miRNA Assay* (nanoString) para la cuantificación de expresión de 827 miARNs.

Tabla 4. Panel a diseño n-Counter de genes asociados al metabolismo óseo y lipídico

Customer Name	HUGO Gene	Probe NSID	Tot Isoforms	# Hit	# Not Hit
ADIPOQ	ADIPOQ	NM_004797.2:790	2	2	0
ALAS1	ALAS1	NM_000688.4:395	8	8	0
ALPL	ALPL	XM_005245818.1:563	7	8	0
AXIN2	AXIN2	XM_017025194.1:1001	7	8	0
BGLAP	BGLAP	NM_199173.6:12	1	0	0
BMP2	BMP2	NM_001200.4:334	1	0	0
COL1A1	COL1A1	NM_000088.3:5210	4	4	0
CPEB4	CPEB4	NM_030627.2:1870	8	6	2
DKK1	DKK1	NM_012242.4:32	1	0	0
IL1B	IL1B	NM_000576.2:840	2	2	0
IL6R	IL6R	NM_000565.2:993	10	10	0
LEP	LEP	NM_000230.2:1875	2	2	0
NAMPT	NAMPT	NM_005746.2:290	1	1	0
PLIN2	PLIN2	NM_001122.3:418	3	3	0
PPARG	PPARG	XM_024453604.1:517	10	11	0
RUNX2	RUNX2	NM_004348.3:1850	6	4	2
SGPP1	SGPP1	NM_030791.3:1060	2	2	0
SMOC1	SMOC1	NM_001034852.1:1990	4	4	0
SOST	SOST	NM_025237.3:0	1	0	0
SP7	SP7	NM_001173467.1:1510	4	4	0
TNFRSF11B	TNFRSF11B	NM_002546.4:0	1	0	0
TNFSF11	TNFSF11	NM_003701.2:490	5	5	0
WNT3A	WNT3A	NM_033131.2:698	2	2	0

3.5.1 Preparación de muestras para su análisis con n-Counter

Las muestras utilizadas en el análisis de expresión génica con la tecnología n-Counter fueron: i) cultivos celulares (inmortalizados y primarios); ii) explantes de tejidos (piel, hueso y osificación heterotópica) y iii) sangre periférica recogida en tubo PAXgene.

Dado que la tecnología n-Counter es capaz de medir expresión génica directamente en lisados celulares sin necesidad de llevar a cabo una extracción de ARN, las células de los cultivos se lisaron utilizando agentes caotrópicos. Para ello, fue necesario obtener primero la suspensión celular de los cultivos (ver apartado 3.8.1) y cuantificar el número de células totales vivas (ver apartado 3.8.2 y 3.8.3). Se transfirieron entonces 15.000 células en suspensión a un tubo de 1,5 ml; se centrifugaron a 1.500 rpm (revoluciones por minuto) durante 8 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 μ l de solución 1:100 de β -mercaptoetanol (Bio-Rad) en *buffer* RLT (Qiagen), esta solución ayuda a la inactivación de ARNasas. Se homogenizó la mezcla en un vórtex por 1 minuto, se centrifugó y el sobrenadante fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

En el caso de los tejidos, se realizó un primer paso de homogenización del tejido mediante fuerza mecánica y un subsecuente lisado. Los tejidos utilizados para análisis de expresión génica se almacenaron en fragmentos <0,5 cm y sumergidos en una solución estabilizadora de ARN (RNAlater™, Invitrogen). Los tejidos se colocaron en solución de lisis (Qiagen) y se homogenizaron mecánicamente utilizando el sistema *TissueLyser* II (Qiagen). La extracción del ARN se realizó con el uso de columnas de afinidad (ver apartado 3.10.1).

La extracción de ARN de la sangre recogida en tubo Paxgene se realizó mediante el uso del kit de extracción *PAXgene blood miRNA* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante y realizando un tratamiento con DNAsa I durante el proceso de extracción. El control de calidad del ARN extraído de los tejidos y de la sangre se llevó a cabo utilizando el sistema

TapeStation 2200 (Agilent). Las muestras deben tener al menos el 50% de los fragmentos por encima de las 200 pares de bases.

3.5.2 Hibridación y lectura en n-Counter

La detección digital en la cual se basa el sistema n-Counter, utiliza un par de sondas únicas para cada molécula de interés, las cuales constan de una sonda *reporter* que porta un código de 6 colores (*Reporter CodeSet*) en su extremo 5', y una sonda de captura que lleva biotina en el extremo 3' (*Capture ProbeSet*), que se usa para fijar el complejo de hibridación (afinidad estreptavidina-biotina) al cartucho una vez se proceda a la lectura de los códigos de colores de cada molécula diana en el equipo n-Counter. Cada combinación de colores identifica una molécula diana de forma inequívoca, pudiendo identificar un máximo de 800 dianas por panel (*Figura 12*).

La hibridación se llevó a cabo mezclando i) un *buffer* de hibridación con las sondas *Reporter CodeSet* para crear una “*master mix*” de la que se utilizaron 8 µl para cada una de las muestras; ii) 1,5 µl de muestra en el caso de lisados celulares y 5 µl (25–100 ng) para el ARN extraído de los tejidos; iii) 2 µl de la sonda *Capture ProbeSet* a cada tubo para tener un volumen final de reacción de 15 µl por tubo. Una vez tuvimos todos los componentes necesarios para la reacción se mezcló por inversión del tubo, se centrifuga cuidadosamente (un *spin* <1.000 rpm) y se incubó a 65 °C durante 16 horas (*over night*). La reacción finalizó bajando la temperatura hasta 4 °C a la espera de su lectura en el n-Counter. Las muestras de ARN fueron normalizadas para garantizar la misma cantidad de ARN en cada muestra de cada experimento y así reducir al mínimo la normalización que se aplicará *a posteriori* a los datos empleando los genes de referencia incluidos en el panel.

Finalmente, las muestras hibridadas se analizaron utilizando la plataforma n-Counter *SPRINT* (*Figura 13*). Para ello, el producto de hibridación se llevó a un volumen de 30-36 µl empleando *buffer* de hibridación, se adicionó al cartucho de muestras y se introdujo en el equipo. Dentro del equipo se llevó a cabo la fijación de los complejos de hibridación en una superficie de estreptavidina del cartucho; se realizó un lavado del exceso de sondas no hibridadas; la lectura de los códigos de colores; y, la correspondencia de cada código de colores con los genes de interés.

3.5.3 Normalización y análisis de datos en n-Counter

Los datos crudos obtenidos del n-Counter se analizaron mediante el *nSolver* (Nanostring). Con este *software* se llevaron a cabo los controles de calidad de los datos crudos verificando

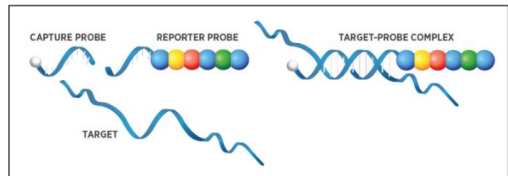


Figura 12. Las sondas de captura (izquierda) se hibridan con la secuencia de interés para formar un complejo de doble cadena (derecha)

Imagen cortesía de NanoString Technologies



Figura 13. Equipo n-Counter SPRINT.

Imagen cortesía de NanoString Technologies

que los parámetros técnicos recomendados por Nanostring estuvieran dentro de los rangos adecuados como, por ejemplo, el análisis de controles positivos y negativos, número de genes detectados por encima del *background* o el número total de *counts* de genes *housekeeping* (HK) entre otros. Las muestras que no cumplieron los parámetros técnicos mínimos recomendados no se incluyeron en análisis posteriores.

El primer paso de normalización que se realizó sirvió para eliminar diferencias en las eficiencias de las reacciones de hibridación entre las muestras. Para ello se calculó la media geométrica de los controles positivos de cada muestra, se calculó la media aritmética de las medias geométricas de todas las muestras y se dividió a continuación la media aritmética entre la media geométrica de cada muestra. Con este cálculo obtuvimos un factor de normalización para cada muestra, que se multiplicó por los *counts* de todos los genes para obtener el valor de expresión corregido. Muestras con un factor de normalización para los controles positivos fuera del rango 0,3-3 se eliminaron del análisis. El valor del *background* se estableció usando un umbral calculado por la media de las sondas negativas más dos desviaciones estándar. Los genes por debajo del umbral establecido fueron eliminados del análisis.

El segundo paso de normalización estuvo enfocado a corregir las variaciones en la cantidad de ARN de cada muestra introducida en la reacción de hibridación. Para ello seleccionamos los mejores genes HK incluidos en el panel, utilizando el algoritmo *GeNorm* implementado en el paquete *CtrlGene* [304] del *software R* [296]. Este algoritmo nos permitió seleccionar no solo los genes más estables dentro de cada experimento, sino que también nos estimó el número óptimo de genes HK que eran necesarios para llevar a cabo una normalización óptima de los datos. Se eliminaron del análisis los HK con una cuantificación cruda menor a 50 *counts* en alguna de las muestras del experimento. El cálculo del factor de normalización para los genes HK seleccionados es similar al empleado para los controles positivos. En este caso se recomienda un mínimo de 3 genes HK para una correcta normalización. Si el factor de normalización calculado para una muestra estuviera fuera del rango 0,1-10 indicaría que los genes HK seleccionados tienen una expresión mucho más baja que la media para esa muestra, con lo cual la muestra debería ser eliminada del análisis.

El cálculo del logaritmo en base dos de la magnitud de cambio (Log_2FC , por sus siglas en inglés) se realizó restando la media aritmética de \log_2 de los *counts* del gen-A en la muestra de la paciente con HOP y la media aritmética de \log_2 de los *counts* del gen A en las muestras del control. Para la representación *Heatmap* se utilizó el paquete *Complex-Heatmap* [305]. Los *Scatterplots* y los índices de correlación de Pearson se usaron para representar los valores de Log_2FC obtenidos de las comparaciones entre tejidos. Todos los gráficos se realizaron con *software R* [296].

3.5.4 Experimento de miARN en n-Counter

Para el experimento de miARNs en sangre periférica extraída de Paciente1 y Paciente2 asilamos la fracción de miARNs junto con la fracción de ARNm, lo que nos facilitó la cuantificación y posterior normalización de la cantidad de ARN que usamos para el ensayo (100 ng totales). En el caso de los miARNs el protocolo que se empleó es ligeramente diferente. En este caso la hibridación de las sondas *reporter* y *capture* sobre los miARNs no fue directa, si no que la hibridación se llevó a cabo a través de unos oligonucleótidos puente con gran especificidad y sensibilidad.

El ARN de control incluido en el kit de ligación permitió monitorizar la eficacia y la especificidad de la reacción de ligación. El procedimiento para llevar a cabo el proceso de ligación consistió en: i) realizar una dilución 1:500 de los controles suministrados para la reacción; ii) preparar una *master mix* mezclando 13 μl de *buffer*, 26 μl de la solución de

oligonucleótidos puente y 6,5 μ l de la dilución 1:500 de los controles preparada en el paso [i]; iii) alicuotar 3,5 μ l de la master mix en cada tubo de reacción; iv) añadir 3 μ l de la muestra de ARN a cada tubo; v) colocar los tubos en el termociclador e iniciar el protocolo (**Tabla 5**); vi) mezclar 19,5 μ l de polietilglicol y 13 μ l de tampón de ligación para preparar la *master mix* de ligación; vii) cuando el termociclador alcanzó los 48 °C, añadir 2,5 μ l de la master mix de ligación a cada tubo (sin apagar el termociclador) y colocar los tubos en el termociclador a 48 °C e incubar durante 5 minutos; viii) abrir el termociclador, y sin retirar los tubos del termociclador quitar las tapas de los tubos y añadir 1,0 μ l de ligasa directamente en el fondo de cada tubo; ix) inmediatamente después de la adición de ligasa iniciar el protocolo de ligación (**Tabla 5**); x) retirar los tubos del termociclador y añadir 1 μ l de enzima de purificación a cada tubo para iniciar el último paso de purificación; xi) añadir 40 μ l de agua tratada con dietilpircarbonato a cada muestra y proceder con la reacción de hibridación.

Tabla 5. Protocolo termociclador para ensayo miARNs en n-Counter (Nanostring)

Protocolo	Temperatura	Tiempo
Alineamiento	94 °C	1 min
	65 °C	2 min
	45 °C	10 min
	48 °C	mantener
	Tiempo total	13 min
Ligamiento	48 °C	3 min
	47 °C	3 min
	46 °C	3 min
	45 °C	5 min
	65 °C	10 min
	4 °C	mantener
Tiempo total	24 min	
Purificación	37 °C	1 hora
	70 °C	10 min
	4 °C	mantener
	Tiempo total	1 hora 10 min

La reacción de hibridación se realizó como se describe en el apartado 3.5.2.

La normalización de los datos obtenidos del panel de miARN se realizó utilizando los 100 miARN más expresados después de eliminar el *background* (media de controles negativos más 2 desviaciones estándar).

3.5.5 Análisis de interacciones de genes dianas de miARN

Para buscar potenciales interacciones de los miARN candidatos que se diferencian en la Paciente1 y la Paciente2 con genes, se utilizó el paquete *miRNetap* [306] de *software* R [296] y las bases de datos: i) PicTar [307]; ii) DIANA [308]; iii) TargetScan [309]; iv) MiRanda [310] y miRDB [311].

El paquete calcula un valor de *ranking* agregado empleando diferentes métodos. En nuestro caso empleamos las medias geométricas de los *rankings* individuales de cada base de datos considerada, que se ha descrito como el método más preciso y con menor número de falsos positivos.

Consideramos sólo los genes diana que aparecieron en al menos tres de las cinco bases de datos utilizadas.

3.5.6 Análisis de enriquecimiento

Se realizó un análisis de sobrerrepresentación en términos, empleando la base de datos de ontología génica (GO, por sus siglas en inglés), para identificar los procesos biológicos relacionados con los genes expresados de forma diferencial en las muestras de las pacientes con HOP y los controles sanos, o muestras de la Pacient1 vs. Paciente2 en el experimento de miARNs.

Para ello consideramos los genes con un $\text{Log}_2\text{FC} > |1,5|$ con respecto al control. Los análisis funcionales se realizaron mediante el paquete del *software R* [296] *Clusterprofiler* [312], aplicando el método de corrección de pruebas múltiples Benjamini-Hochberg considerando un valor significativo cuando el P-valor $< 0,05$. Utilizamos la base de datos GO como referencia considerando un máximo de 550 genes y un mínimo de 20.

En el caso del experimento de miARNs y con el fin de evitar falsos positivos, para el análisis de enriquecimiento se seleccionaron únicamente los miARN con valores superiores a 50 *counts* en alguna de las muestras analizadas, un $\text{Log}_2\text{FC} > |1,5|$ y con un valor de *ranking* agregado por debajo de 100.

3.6 ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO EXPLORATORIO EN HOP CON TECNOLOGÍA RNASEQ

Las nuevas tecnologías de secuenciación (NSG, por sus siglas en inglés) permiten el descubrimiento y análisis amplio de transcritos incluyendo la determinación de variantes de *splicing* y la expresión de alelos específicos [313].

En nuestro estudio se utilizó la secuenciación RNAseq para identificar y cuantificar secuencias de ARN determinantes en el estudio de las pacientes con HOP en muestras de sangre periférica obtenidas a los 5 años de la Paciente1 y a los 2 años en la Paciente2.

3.6.1 Extracción de ARN

La purificación total de ARN a partir de muestras sanguíneas (**Tabla 3**) se realizó mediante método de extracción por columnas de sílice *PAXgene Blood miRNA kit* (Quiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad y calidad del ARN extraído se verificó utilizando electroforesis en un *chip* de *Agilent Bioanalyzer Tapestation 2200* (Agilent). La calidad de ARN se determinó mediante el cálculo de RIN (Número de Integridad del ARN, por sus siglas en inglés) el cual tiene un rango de 1 a 10 siendo este último el de mayor calidad.

3.6.2 Secuenciación RNAseq

La medición de expresión del ARN se realizó siguiendo el método estandarizado descrito por Salas et al., 2016 [314]. La secuenciación de los transcritos se obtuvo mediante tres pasos de acuerdo con las recomendaciones de Illumina: preparación de las librerías, amplificación de las muestras para generar grupos clonales, y la secuenciación masiva. La construcción de las librerías de secuenciación partió del aislamiento de ARN, transcripción a cDNA, amplificación mediante primers *random* y finalmente la ligación de los adaptadores de la secuenciación. La calidad de las librerías se analizó con el sistema *Bioanalyzer 2100 (High Sensitivity DNA assay)* y la cuantificación se determinó por PCR en tiempo real utilizando el sistema *LightCycler 480* (Roche). Antes de la generación de grupos en *cBot* (Illumina) se realizó un *pool* equimolar de los cADN de la librería, el cual fue secuenciado utilizando el método de extremos emparejados (100 x 2; *paired-end*) utilizando el secuenciador *HiSeq 2500* (Illumina) y una calidad de lectura del 85% $> Q30$.

3.6.3 Análisis de datos

El post-procesado de los datos de RNAseq comenzó con un control de calidad de los datos crudos obtenidos usando el software *FastaQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) para asegurarnos de que no existen problemas de secuenciación que puedan afectar a los análisis subsiguientes. Después de descartar las muestras con baja calidad, o repararlas si es posible (eliminado el extremo 3' problemático y adaptadores) empleando el paquete *Trimmomatic* [315], los datos crudos pre-procesados fueron alineados contra el genoma humano de referencia (GCh38,v.104) usando *ultrafast universal RNA-seq aligner STAR* [316]. Se comprobó la calidad de los alineamientos y se eliminaron los alineamientos secundarios y de baja calidad usando la herramienta *SAMtools* [317]. Para contar el número de *reads* que mapean con cada gen (*counts* por gen) se usó el archivo .bam del alineamiento filtrado y el software *RSEM* [318].

Debido al número de muestras que tuvimos ($n = 2$), seleccionamos un paquete que nos permitió hacer una aproximación exploratoria del análisis de expresión diferencial basado en un enfoque no paramétrico sin necesidad de usar réplicas (NOISeq; [319]). NOISeq pudo simular réplicas técnicas basándose en la suposición de que los valores de expresión (*counts*) siguieron una distribución multinomial, donde las probabilidades para cada gen en la distribución multinomial fueron la probabilidad de que un *read* mapee con ese gen. Estas probabilidades de mapeo se aproximaron utilizando los valores de expresión en la única muestra de cada una de las condiciones experimentales correspondientes. Dada la profundidad de secuenciación (cantidad total de lecturas) de la única muestra disponible, el tamaño de la simulación fue un porcentaje de esta profundidad de secuenciación (en nuestro caso el 20% de los *reads*), permitiendo a su vez una pequeña variabilidad (seleccionamos un 2%). La simulación la hemos llevado a cabo generando 10 réplicas para cada una de las condiciones analizadas (HOP asintomática vs. HOP grave).

NOISeq creó una distribución de ruido de los cambios de expresión contrastando las diferencias de *FoldChange* (M) y las diferencias de expresión absolutas (D) para todos los genes en las muestras dentro de la misma condición. Esta distribución de referencia se utilizó entonces para evaluar la probabilidad de que los valores M y D calculados entre dos condiciones para un determinado gen fueron parte del ruido o representaron una verdadera expresión diferencial. Si las probabilidades $\text{Pr}(\text{expresión diferencial})/\text{Pr}(\text{expresión no diferencial})$ eran superiores a un umbral determinado, se consideró que el rasgo se expresó diferencialmente entre condiciones. En este caso hemos empujado como punto de corte un valor de probabilidad $> 0,95$. El valor de “*ranking*” obtenido fue un valor estadístico resumen de M y D, y es igual a $-\text{sign}(M) \times \sqrt[2]{M^2 + D^2}$.

Se excluyeron los genes poco expresados utilizando el método CPM (parámetro recuentos por millón) del paquete NOISeq, eliminando así los genes cuya suma del valor de expresión de todas las muestras estuvo por debajo de 1 (valor seleccionado en nuestro caso). Además, establecimos un umbral para el coeficiente de variación por condición de 100 (valor seleccionado en nuestro caso), para eliminar genes con valores de expresión incoherente.

Como método de normalización de los datos de expresión empleamos la media recortada ponderada de los valores M (TMM, por sus siglas en inglés) [320]. Es un método utilizado habitualmente que se basa en la suposición de que la mayoría de los genes no estuvieron diferencialmente expresados.

El análisis de enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados (con una probabilidad $>0,95$) lo realizamos con el paquete *goseq* [321], que consideró el sesgo de la longitud de los genes presentes en el conjunto de datos. Se calculó una función de ponderación de la probabilidad (PWF, por sus siglas en inglés), que puede considerarse como la probabilidad

de que un gen se exprese de forma diferencial, basándose únicamente en su longitud. Esta función tiene un enfoque robusto, ya que se calculó directamente a partir del conjunto de datos, corrigiendo únicamente el sesgo de longitud presente en nuestros datos. Para considerar el sesgo de longitud génica en un análisis de términos GO con datos de RNAseq, a diferencia de lo que sucede con los microarrays, no se utilizó la distribución hipergeométrica como distribución nula para la pertenencia a una categoría. En nuestro caso utilizamos la distribución de Wallenius para aproximar la verdadera distribución nula usando el paquete *goseq* [321]. Cuando se estableció la distribución nula, se comprobó si cada categoría GO estuvo sobre-representada o infra-representada en el conjunto de genes expresados diferencialmente y se utilizó el valor nulo para calcular el P-valor de la sobre- o infra-representación.

3.7 PROTEÓMICA DIFERENCIAL DE SUEROS DE PACIENTES HOP Y CONTROLES

El análisis proteómico es una de las aproximaciones que permite identificar biomarcadores, además, aporta información clave para entender los procesos biológicos que ocurren en la enfermedad y posibles mecanismos de regulación.

El estudio de enfermedades con una alta complejidad es uno de los retos a los que se enfrentan las tecnologías de identificación de proteínas, en este sentido, el acoplamiento de dos métodos como son la separación por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) y la identificación y cuantificación con el método adquisición de ventana secuencial de todos los espectros de iones de fragmentos teóricos y espectrometría de masas (SWATH-MS, por sus siglas en inglés) permite un aumento en el rendimiento de las muestras y de la cuantificación así como de su precisión y reproducibilidad.

Los análisis diferenciales de proteínas en sueros de pacientes con HOP y pacientes sanos, todos con 7 años de edad, se realizaron con tecnología Sciex de alta resolución TripleTOF (tiempo de vuelo con Triple cuadrupolo, por sus siglas en inglés) utilizando métodos estandarizados para el procesado de las muestras [322] con el apoyo de la plataforma de Proteómica del IDIS.

3.7.1 Depleción y alquilación de proteínas abundantes de sueros

La depleción de las proteínas más abundantes en el suero se realizó añadiendo Ditiotreitolo (DTT, por sus siglas en inglés; 500mM, Sigma-Aldrich) a cada muestra (30 μ l) y mezclando mecánicamente. Las muestras se incubaron (aproximadamente 1h) hasta observar un precipitado blanco y viscoso, a continuación, se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo nuevo para su alquilación y digestión enzimática.

3.7.2 Digestión proteica

Las muestras deplecionadas se separaron por electroforesis en gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) al 10% de poliacrilamida. La electroforesis se finalizó una vez que las muestras penetraron el gel de resolución. Las bandas de proteínas se visualizaron con tinción fluorescente con SYPRO Ruby (Lonza Bioscience), se cortaron y se digirieron siguiendo el protocolo modificado de Shevchenko et al., 1996 [323], los fragmentos de gel se redujeron en una solución de 10mM DTT (Sigma-Aldrich), 50mM de bicarbonato de amonio (Sigma-Aldrich) y fueron alquiladas utilizando una mezcla de 55mM de iodoacetamida (Sigma-Aldrich) con 50 mM de bicarbonato de sodio (bicarbonato de sodio). Se lavaron en una solución de 50mM de bicarbonato de sodio en 50% de metanol grado HPLC (Sigma-Aldrich), y se deshidrataron utilizando acetónitrilo grado HPLC (Sigma-Aldrich) y un concentrador al vacío (*SpeedVac*, ThermoFisher). Las muestras deshidratadas se trataron con una solución a 20 ng/ μ l de tripsina porcina modificada (Promega) en 20mM de bicarbonato de

amónio (Sigma-Aldrich), se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Los péptidos se extrajeron incubando las muestras en 40 µl de 60% de acetonitrilo (Sigma-Aldrich) en 0,5% ácido fórmico (Sigma-Aldrich). Los péptidos extraídos fueron mezclados entre ellos (*pool*), fueron concentrados usando *SpeedVac* y almacenados a -20 °C hasta su uso.

3.7.3 Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC/MS-MS)

Los péptidos de cada muestra obtenidos tras la digestión se separaron utilizando cromatografía en fase reversa, realizando cada muestra por triplicado. El gradiente se creó utilizando micro-cromatografía de líquidos (*NanoLC400*, Sciex; **Figura 14**) en fase reversa que además está acoplado a un espectrómetro de masas de alta velocidad (*TripleTOF 6600*, Sciex; **Figura 14**) que llevó a cabo la identificación y cuantificación de la proteína utilizando un método de adquisición dependiente de datos (DDA, por sus siglas en inglés).

La cromatografía se llevó a cabo utilizando la columna analítica de sílice Eksigent C18CL 150, de 0,30 mm (Sciex), y columna de trampa YMC-TRIART C18 (YMC Technologies); ambas con un tamaño de partícula 3µm, y un poro de 120 Å, conectadas en línea. Los péptidos se separaron utilizando un gradiente a 90 minutos que va del 2% de fase móvil-A (2% de acetonitrilo y 0,1% de ácido fórmico) a 90% de fase móvil-B (100% acetonitrilo y 0,1% de ácido fórmico) con una inyección de volumen de muestra de 4 µL (~ 4 µg de proteína).

La adquisición de datos se obtuvo mediante el *software Analyst TF* del espectrómetro de masas (MS) *TripleTOF* (Sciex). Los criterios para el cambio de polaridad se establecieron en: iones mayores a 350 m/z (masa/carga) y menores a 1.400 m/z, con un estado de carga de 2-5, una tolerancia de masa de 250 ppm (partes por millón) y un umbral de abundancia de más de 200 conteos.

La calibración de los equipos se realizó cada 4 horas utilizando como calibrante externo una mezcla de péptidos tripticos comerciales PepCalMix (Sciex).

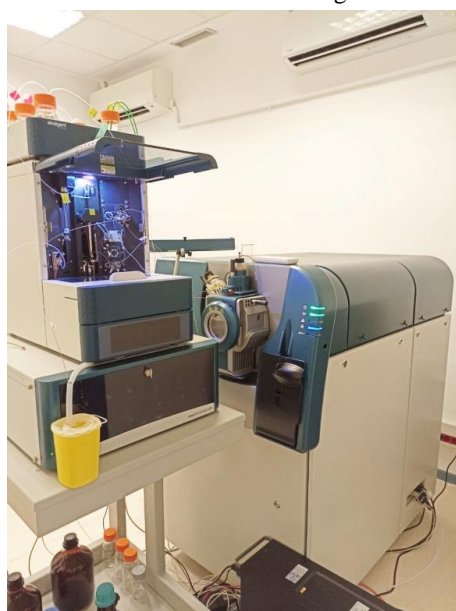


Figura 14. Equipo HPLC (*NanoLC400*, Sciex) acoplado a *TripleTOF 6600* (Sciex)
Imagen cortesía de Sciex por la Plataforma de Proteómica-IDIS

3.7.4 Análisis de datos proteómicos

Los datos fueron procesados utilizando el *software ProteinPilot* (Sciex) el cual usó el algoritmo *Paragon* [324] para la búsqueda en la base de datos y su agrupación. La base de datos usada como referencia fue Uniprot, específica para humanos [325]. La tasa de falsos descubrimientos (FDR, por sus siglas en inglés) se determinó utilizando un método de ajuste no lineal, que mantuvo solo los resultados con 1% de FDR [324].

Las proteínas identificadas por LC-MS/MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem, por sus siglas en inglés) se categorizaron y sobrerrepresentaron en términos GO en: Procesos Biológicos (BP), Funciones Moleculares (MC) y Componentes Celulares

(CC) relacionados con grupos de proteínas dentro de un conjunto de datos, además se realizó un análisis de vías de señalización utilizando la base de datos Reactome [326].

Los análisis funcionales y de vías de señalización, se realizaron utilizando el *software* R [296] con las paqueterías *ClusterProfiler* [312] y *ReactomePA* [327].

3.7.5 Cuantificación de proteínas mediante análisis SWATH-MS

3.7.5.1 Creación de librerías de proteínas

La creación de las librerías espectrales del MS/MS se realizó mediante el análisis de los péptidos por el método de colección de datos en tándem DDA, utilizando el sistema *NanoLC400* (ver apartado 3.7.3) [328–330].

Se preparó el *pool* de todas las muestras por grupo de análisis y cada *pool* de muestras se sometió a una separación utilizando columnas Eksigent C18CL (ver apartado 3.7.3) con un flujo de 5 ml por minuto, usando como solventes A: agua; y B: acetonitrilo. Un gradiente del 5% al 95% de solvente B durante 30 minutos, 5 minutos a 90% solvente B y finalmente 5 minutos a 5% de solvente B para equilibrar la columna como se describe en el apartado 3.7.3. Se inyectaron los péptidos eluidos directamente en el equipo *TripleTOF* 6600, operado con adquisición de DDA en modo de ion positivo. La interfaz utilizada en el micro HPLC y el MS fue una fuente micro con aplicación de 2.600 voltaje (V).

El modo de adquisición consistió en un estudio de MS con escaneo de masa de 400 a 1.250 m/z, seguido de un escaneo MS/MS desde 100 a 150 m/z, con tiempo de adquisición de 25 ms en ambos casos. Los fragmentos individuales cargados iónicamente, se excluyeron del análisis MS/MS.

La identificación de péptidos y proteínas se realizó utilizando el *software ProteinPilot* (ver apartado 3.7.4) y la base de datos Uniprot [325], especificando la alquilación Cys con iodoacetamida. Se consideraron solo las proteínas identificadas con un FDR del 1%, tanto para péptidos como proteínas,

Los espectros MS/MS de los péptidos identificados se utilizaron para generar la librería espectral para la extracción de los picos SWATH-MS usando el complemento MS/MS^{ALL} (*SWATHAcquisition MicroApp*) para el *software PeakView* (Sciex). Los péptidos con un *score* de confianza del 99% obtenidos con *ProteinPilot*, se incluyeron dentro de la librería.

3.7.5.2 Cuantificación relativa por adquisición SWATH-MS

La cuantificación de las proteínas identificadas por sus péptidos se realizó por el método de adquisición SWATH-MS con el equipo *TripleTOF* 6600. Las muestras se analizaron por triplicado utilizando el método de adquisición independiente de datos en SWATH-MS, el cual consistió en ciclos repetidos de escaneos de adquisición de 100 TOF MS/MS (de 400 a 1.500 m/z, modo de alta sensibilidad y 50 ms de tiempo de adquisición) de superposición entre ellos.

La extracción de datos de los fragmentos se realizó por *PeakView* usando MS/MS^{ALL}. Se seleccionaron hasta diez péptidos por proteína y siete fragmentos por péptido en función de la intensidad de la señal, cualquier péptido compartido y modificado se excluyó del análisis y la selección de las proteínas consideró un FDR menor al 1%. Los tiempos de retención de los péptidos seleccionados para cada proteína se ajustaron utilizando péptidos de tiempo de retención indexado que van aumentando y eluyendo en cada muestra al final de todo el análisis.

Las áreas de los picos de péptidos se obtuvieron de la suma de los picos de cada fragmento y utilizando *PeakView*, se calculó un FDR y el *score* para cada péptido de acuerdo con sus componentes espectrales y cromatográficos, considerando solo los péptidos por debajo del 5%

de FDR. La cuantificación se llevó a cabo sumando las áreas de los 10 picos y 7 fragmentos por péptido correspondientes a cada proteína.

El análisis de cuantificación relativa y normalización de los datos integrados se realizó utilizando el *software MarkerView* (Sciex), el cual compensó las variaciones menores en los valores de masa y tiempo de retención, lo que garantizó que los compuestos idénticos en diferentes muestras fueran comparables entre sí con alta precisión.

Se realizó una normalización global basada en la suma total de todas las áreas de los picos extraídos de todos los péptidos y sus réplicas para cada muestra, con la finalidad de controlar la pérdida de muestra durante el procesamiento [331].

3.7.6 Análisis estadístico en proteómica

Debido a la reducida cohorte de pacientes con HOP, los análisis cualitativos se representaron en tablas descriptivas. Para los datos cuantitativos se ha evaluado la normalidad de los datos para cada proteína en la población control utilizando la prueba de Shapiro-Wilks. Cuando se verificó esta condición, se realizó una prueba *t-Student* para evaluar si los marcadores proteicos en controles eran significativamente diferentes al valor de la paciente que corresponda (o el valor promedio de ambas). Para aquellas proteínas que no siguieron una distribución normal se hizo uso del contraste de Wilcoxon. Se consideraron las proteínas significativas aquellas con un P-valor menor que 0,05 y con un cambio de expresión de $\text{Log}_2\text{FC} > |1|$.

Los análisis comparativos de expresión proteica diferencial entre las dos pacientes con HOP se realizó utilizando *t-Student*.

El nivel de significancia considerado fue de 0,05, ajustando los P-valores por el método FDR para evitar resultados falsos positivos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el *software R* [296].

La exclusión de proteínas se realizó considerando la existencia de datos faltantes para al menos una muestra involucrada en cada grupo de análisis.

3.8 GENERALIDADES DE LOS CULTIVOS CELULARES

En este apartado se describen los procedimientos generales aplicados, tanto para la línea celular como para los cultivos primarios utilizados en este trabajo.

Los procedimientos se realizaron siempre dentro de cabinas de bioseguridad, salvaguardando la esterilidad del sistema.

Los cultivos primarios utilizados en este trabajo presentaron una proliferación en monocapa. Fueron cultivados en medio de cultivo Dulbecco's *Modified Eagle's* alto en glucosa (DMEM, por sus siglas en inglés, que contiene añadidos 4500mg/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio; Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés; Gibco) y 1% de antibiótico (penicilina 10.000 unidades y estreptomina 10mg/ml; Sigma-Aldrich).

Para el cultivo de la línea celular de osteosarcoma humano (SaOS-2, cedida por el laboratorio de patologías musculoesqueléticas - E038/IDIS) se utilizó, medio de cultivo DMEM/*Nutrient Mixture* F-12 Ham, (DMEM-F12, 3.150 mg/l de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio 0,055 g/l; Sigma-Aldrich); suplementado con 5% de FBS (Gibco) y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomina; Sigma-Aldrich).

Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo, para ello fueron colocadas en una incubadora a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. El recambio del medio de cultivo se realizó cada tercer día y al alcanzar una confluencia del 95% las células se subcultivaron, se utilizaron en los experimentos o se prepararon para su criopreservación.

3.8.1 Subcultivo celular

El subcultivo de las células en monocapa involucró el rompimiento de las uniones que tenían con la superficie donde fueron cultivadas. Para ello se utilizaron enzimas proteolíticas como la mezcla de tripsina/EDTA.

El primer paso del subcultivo celular consistió en descartar el medio de cultivo y realizar un lavado con PBS estéril (Sigma-Aldrich) para eliminar todos los restos del medio de cultivo. Se añadió tripsina/EDTA y se incubó a 37 °C, con 5% CO₂ y 95% de humedad durante 15 minutos (este tiempo puede variar dependiendo del tipo celular).

Una vez que las células se desprendieron y disociaron, se inactivó la enzima adicionando al menos el doble de volumen de medio de cultivo completo. Esta suspensión celular se diluyó en medio de cultivo completo hasta obtener la concentración requerida para cada experimento y fue transferida a las nuevas placas en donde se mantuvieron en las condiciones de cultivo para su crecimiento.

3.8.2 Conteo celular

Para monitorizar el crecimiento celular, así como para normalizar las pruebas *in vitro* fue necesario partir de un número concreto de células para optimizar los resultados y asegurar su reproducibilidad. El conteo celular se llevó a cabo en un hematocitómetro, mejor conocido como cámara de Neubauer, la cual se asemeja a un portaobjetos de vidrio con dos cámaras, una a cada extremo. Cada cámara tiene un área cuadrículada de nueve cuadrados con dimensiones de 3x3 mm. La cámara se cubrió con un cubreobjetos lo que permite que exista una separación de exactamente 0,1mm, este es el espacio suficiente que aseguró que cada uno de los nueve cuadrados contuviera un volumen de 0,001 ml (*Figura 15*).

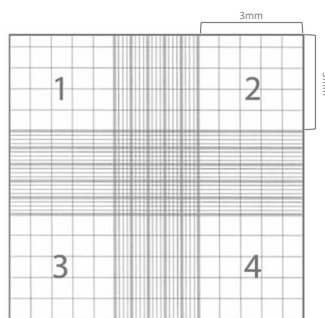


Figura 15. Esquema de la cuadrícula en la cámara de Neubauer

Antes de su uso, la cámara debía estar limpia y completamente seca. Se colocó el cubreobjetos sobre la cámara y a continuación se agregaron 10 µl de suspensión celular en cada lado de la cámara, permitiendo que el líquido se extienda sobre la superficie de los cuadrantes por capilaridad. Para su visualización, la cámara se colocó en un microscopio invertido con un aumento de 100X y se contaron las células localizadas en los cuatro cuadrantes que se encuentran enumerados en la *Figura 15*. Se calculó el promedio de las células por cada cuadrado y se multiplicó por el factor de dilución. Si la suspensión celular no fue diluida para su conteo, el factor de dilución fue de 10⁴ células/ml.

3.8.3 Viabilidad celular

La prueba de viabilidad celular fue una herramienta importante para la determinación de poblaciones celulares vivas. El método más común y rápido fue la determinación de la integridad de la membrana celular con el uso de colorantes como el azul de tripano, un colorante azoico derivado de la toluidina, el cual quedó excluido de células viables pero captado y retenido por las células muertas que tienen rotura de membrana.

Para realizar la técnica de viabilidad celular por azul de tripano se mezclaron 10 µl de la preparación de azul de tripano (0,4% azul de tripano en PBS) con 10 µl de la suspensión celular y se dejó incubar durante 2 minutos. Se introdujeron 10 µl de la mezcla en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo celular.

Para estimar la cantidad de células vivas, el conteo celular se hizo únicamente de las células sin teñir, para su conteo final se consideró el factor de dilución realizado con el azul de tripano.

Para el cálculo de la viabilidad celular se consideró el número de células viables (no teñidas) dividido entre el número total de células y el resultado fue expresado en porcentaje.

3.8.4 Criopreservación celular

La criopreservación permitió mantener los cultivos celulares almacenados por años a temperaturas por debajo de los $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ y aportó como ventajas la generación de stocks de las poblaciones celulares y la preservación de células con finita proliferación, asegurando su fenotipo y evitando la inestabilidad genética o presión selectiva.

A medida que la temperatura va disminuyendo, el líquido intracelular se va cristalizando y si no se tiene control de esto, la célula puede estallar, por lo que el uso de agentes criopreservantes como el dimetilsulfóxido (DMSO) se empleó para mitigar ese efecto.

El procedimiento de criopreservación comenzó con la preparación del medio de congelación, se preparó medio de cultivo completo al que se le adicionó 10% DMSO (Sigma). Se mantuvo en frío hasta su uso. Por otro lado, se obtuvo la suspensión celular siguiendo el apartado 3.8.1; se contaron las células viables siguiendo el apartado 3.8.2 y 3.8.3; y se calculó la cantidad de medio de congelación necesaria para que, con el conteo celular, pudiéramos asegurar tener aproximadamente 1×10^6 células/ml al momento de la criopreservación. La suspensión celular se centrifugó a 1.500 rpm durante 15 minutos. Al pellet obtenido se le adicionó el medio de congelación por goteo y se mezcló bien hasta asegurarse que el pellet se había disgregado y que teníamos una mezcla homogénea. Se transfirió 1ml de la suspensión a crioviales y se colocaron en el contenedor de congelación controlada *Mr. Frosty* (Thermo Fisher) previamente refrigerado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas para posteriormente transferir los crioviales al tanque de nitrógeno líquido.

3.8.5 Descongelación

Cuando fue necesario realizar una descongelación, se hizo en el menor tiempo posible para evitar muerte celular, ya que el agente criopreservante es citotóxico a temperatura ambiente.

Para ello fue necesario tener todo preparado dentro de la cabina de bioseguridad y el criovial tenía que ir directamente del tanque de nitrógeno a un baño maría a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez que el líquido del criovial estuvo completamente descongelado, se transfirió la suspensión celular descongelada a una placa, la cual contenía medio completo y se incubó en condiciones de cultivo para su estabilización y proliferación.

3.9 CULTIVOS PRIMARIOS

Los cultivos primarios utilizados para este trabajo se obtuvieron a partir de tejido procedente de intervenciones quirúrgicas realizadas en el departamento de cirugía pediátrica del CHUS.

3.9.1 Aislamiento y cultivo primario de osteoblastos “like”

El aislamiento de células osteoblásticas se realizó por el método de explantes [332] a partir de tejido óseo (hueso y osificación). Para este procedimiento fue esencial contar con el material de disección esterilizado (pinzas, fórceps, tijeras, escápelo) y trabajar en condiciones de esterilidad (cabina de bioseguridad).

Se colocaron los explantes en placas de cultivo (*Figura 16a*) que contenían de 5 a 10 ml (dependiendo del tamaño) de una mezcla de PBS estéril con 1% de antibiótico para su lavado. Con ayuda del material de disección se removió todo el tejido blando y adyacente al tejido óseo. Es importante remover cualquier hematíe, ya que estas impedirían el crecimiento osteoblástico.

Una vez que el explante estuvo completamente limpio (*Figura 16b*), se diseccionó en fragmentos de entre 3-5 mm de diámetro (*Figura 16c*) y se colocaron en un tubo cónico con PBS estéril para su lavado con agitación mecánica. En caso de ser necesario, debieron repetirse los lavados hasta obtener fragmentos completamente limpios.

En una placa de cultivo de 100 mm de diámetro se colocaron los fragmentos del tejido, se añadió medio completo por goteo y se dejó incubar en condiciones de cultivo durante siete días manteniendo la placa completamente estática. Una vez completado este tiempo se renovó el medio de cultivo tres veces por semana evitando, en todo momento, que los explantes flotarán (*Figura 16d*). La confluencia se alcanzó entre las semanas cuatro y seis, a continuación, se retiraron los fragmentos de la placa y las células se dividieron para su subcultivo y criopreservación como se menciona en los apartados 3.8.1 y 3.8.5. El proceso completo de aislamiento a partir de los explantes se realizó hasta dos veces, para mejorar lo más posible la cantidad de células, siguiendo el mismo procedimiento.

Los experimentos con cultivos primarios de osteoblastos “like”, en todos los casos, se realizaron con células del primer subcultivo, para mantener la integridad fenotípica de los mismos.

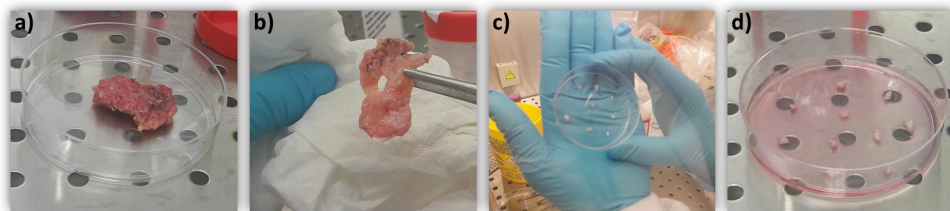


Figura 16. Secuencia de imágenes del aislamiento de células osteoblásticas a partir de una osificación. a) Osificación heterotópica con tejido adyacente; b) Osificación heterotópica limpia; c) Fragmentos de explante; d) Fragmentos de explante en medio de cultivo

3.9.2 Aislamiento y cultivo primario de fibroblastos

Para el aislamiento de fibroblastos a partir de piel extraída quirúrgicamente, se utilizaron dos métodos: aislamiento por explante [333] y por digestión enzimática [334] descritos a continuación.

Un paso previo en cualquiera de los dos métodos consistió en un lavado de la piel extraída. Se lavó en una solución de etanol al 70% e inmediatamente después se sumergió en una solución con antibiótico al 2% (penicilina/estreptomicina; Sigma-Aldrich), para evitar contaminantes en el aislamiento celular. Finalmente se lavaron con PBS y se continuó con el protocolo de aislamiento.

3.9.2.1 Aislamiento de Fibroblastos por método de explante

El tejido limpio se colocó en una placa de cultivo de 100mm de diámetro para su disección en fragmentos (*Figura 17a*), los cuales debían tener un tamaño de alrededor de 4mm (*Figura 17b*).

Una vez seccionado el tejido, se transfirió a una placa de seis pocillos. Para este método fue necesario una correcta adhesión del tejido a la placa de cultivo. Los pocillos fueron tratados con una solución de 1% de gelatina durante 30 a 60 minutos. Finalizado el tiempo, se aspiró la solución de gelatina y se colocaron los explantes diseccionados; alrededor de 2 o 3 fragmentos por pocillo. Se añadió sobre el tejido y por goteo el medio de cultivo completo al que se le

aumentó el suplemento de FBS al 20%. Se incubaron en condiciones de cultivo y se cambió el medio tres veces por semana.

Una vez que se alcanzó la confluencia, las células fueron divididas para el subcultivo y criopreservación (apartados 3.8.1 y 3.8.5)

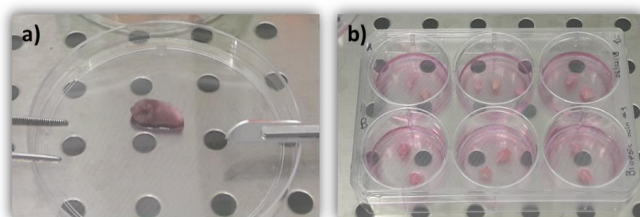


Figura 17. Aislamiento de fibroblastos a partir de piel por método de explante
a) Explante de piel; b) disección de tejido y cultivo en gelatina.

3.9.2.2 Aislamiento de Fibroblastos por método de explante

Este método consistió en una secuencia de digestiones enzimáticas a las que se sometieron al explante de piel para procurar un aislamiento y cultivo puro de fibroblastos. La primera digestión permitió la separación de las capas de la piel en dermis y epidermis.

El tejido (**Figura 18a**) se cortó en fragmentos de 0,5 cm aproximadamente (**Figura 18b**) y se colocaron en una placa de seis pocillos. El número máximo de fragmentos sembrados nunca superó los diez por pocillo. Se adicionó una solución de Dispasa® I (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mg/ml en medio de cultivo DMEM libre de FBS. Se incubó durante 16 horas a 4 °C. Se separó la epidermis de la dermis utilizando pinzas estériles.

En una segunda etapa de digestión, la dermis se transfirió a una placa de cultivo que contenía una solución de 0,2 mg/ml de colagenasa tipo I, 0,1% de tripsina (Sigma-Aldrich) en medio de cultivo DMEM libre de FBS y se incubó toda la noche a 37 °C. El tejido se disgregó completamente y el sobrenadante se pasó por un filtro de 100 µm para remover restos de tejido. Se centrifugó a 200 g durante 10 minutos; el pellet se resuspendió en medio de cultivo DMEM completo; y, se transfirió a una placa de cultivo.

Se cambió el medio de cultivo cada tercer día y al alcanzar su confluencia las células se dividieron para su subcultivo y criopreservación (apartados 3.8.1 y 3.8.5).

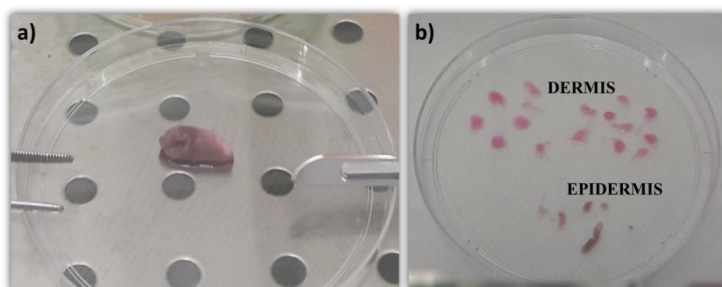


Figura 18. Aislamiento de fibroblastos a partir de piel por método de digestión enzimática
a) explante de piel; b) separación epidermis de la dermis

3.9.3 Aislamiento y cultivo primario de pre-adipocitos

El aislamiento de células pre-adipocíticas desde tejido graso fue un procedimiento que tenía que realizarse dentro de las primeras 1,5 horas después de haber sido extirpado el tejido.

El primer paso consistió en realizar un lavado con una solución al 5% de antibiótico (penicilina/estreptomicina; Sigma-Aldrich) en PBS para remover tejido conectivo adyacente o hematíes. El tejido limpio se cortó en fragmentos de aproximadamente 1 cm². Éstos se colocaron en PBS y se centrifugaron durante 5 minutos a 1.800 rpm. Se descartó el sobrenadante y los fragmentos lavados se transfirieron a una placa de cultivo que contiene 5 ml de una solución de 0,2% de colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich) en medio de cultivo de dispersión (DMEM, Sigma-Aldrich; sin FBS; y suplementado con 2% de antibiótico penicilina/estreptomicina; Sigma-Aldrich) precalentada a 37 °C. Se incubó a la misma temperatura, en agitación continua (250 rpm), durante 60-120 minutos. La suspensión se pasó a través de un filtro de 100 µm y se añadió medio DMEM (Sigma-Adrich) suplementado con 5% de FBS (Gibco) y 2% antibiótico (penicilina/estreptomicina; Sigma-Aldrich); con la finalidad de neutralizar la actividad de la colagenasa. Se centrifugó a 1.800 rpm durante 10 minutos. La centrifugación permitió distinguir las diferentes fases acuosas: una fina capa transparente-amarilla que correspondía a la grasa liberada; por debajo de ésta, se observó una fase blanca que correspondía a los adipocitos maduros; una fase acuosa que era el medio de dispersión; y, un pellet de células de la fracción vascular estromal del tejido adiposo, donde se encontraban las células precursoras (**Figura 19**). Se descartaron las capas superiores y el pellet se resuspendió en 10 ml de medio de dispersión. La suspensión celular se pasó a través de un filtro de 40 µm y se centrifugó a 950 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 10 ml de medio de dispersión y se centrifugó nuevamente. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en medio de cultivo DMEM completo (ver apartado 3.8), se transfirió la suspensión celular a las placas y se dejó incubar en condiciones de cultivo (ver apartado 3.8).

Se cambió el medio cada tercer día y al alcanzar su confluencia las células se dividieron para subcultivo y criopreservación (ver apartados 3.8.2 y 3.8.5).

Los pre-adipocitos primarios tuvieron una tasa de crecimiento dependiente del número de subcultivos, una vez superado el pase 10 la tasa decayó, por lo que todos los experimentos se realizaron utilizando los primeros pases.

3.10 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR

3.10.1 Extracción y cuantificación de ARN

El método de extracción de ARN utilizado se basó en la homogenización y lisis celular con una solución de fenol/guanidina (QIAzol, Qiagen) y su captura mediante el uso de columnas.

La primera parte de la extracción fue la lisis celular, la cual se consiguió agregando QIAzol a la monocapa de células en cada pocillo, se mezcló por pipeteo y el lisado se transfirió a un

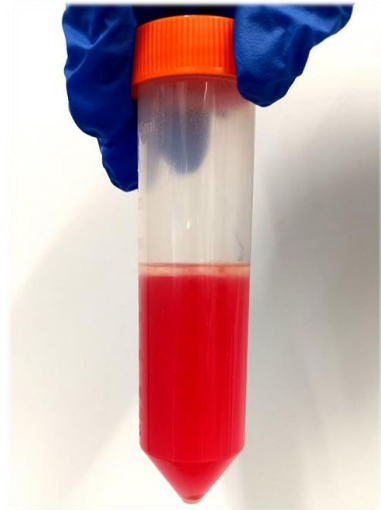


Figura 19. Diferentes fases acuosas en el aislamiento de células pre-adipocíticas desde tejido graso

tubo de 1,5 ml. Se incubó 5 minutos y a continuación se realizó la separación de fases añadiendo cloroformo. Se incubó 3 minutos y se centrifugó a 4 °C a una fuerza centrífuga relativa de 14.000g durante 20 minutos. La mezcla quedó dividida en 3 fases, una fase orgánica (fenol-cloroformo), una interfase (proteínas y ADN) y la fase acuosa conteniendo el ARN. La segunda parte de la extracción se realizó empleando columnas de membrana de sílice (RNeasy Mini Kit, Qiagen), donde el ARN fue retenido de manera específica y los contaminantes se eliminaron mediante lavados. El ARN total se eluyó con agua libre de ARNasas. Se cuantificó y se determinó la calidad de ARN mediante el uso de espectrofotometría (NanoDrop *ONE Microvolume*, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260 nm y la pureza la medimos utilizando el índice de pureza A260/A280, que corresponde a la relación entre la absorbancia corregida a 260nm y la absorbancia corregida a 280nm. Consideramos una pureza aceptable valores iguales o mayores a 1,8 en la relación A260/A280.

3.10.2 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

Para realizar la transcripción inversa o retrotranscripción, se utilizaron 8 µl de ARN total a una concentración de 2,5 ng/µl, al que se le añadió 1 µl de *Random Primers*; dNTP Mix (Invitrogen); y, 2 µl de agua libre de ARNasas. La mezcla se calentó a 65 °C durante 5 minutos y se enfrió en hielo inmediatamente. Adicionamos 4 µl de 5X *First-Strand Buffer* (Sigma-Aldrich), 2 µl de DTT (Sigma-Aldrich) y 1 µl de *RNaseOUT* (Invitrogen). Se mezcló e incubó a 25 °C durante 2 min. Se añadió 1 µl de la enzima *SuperScript Reverse Transcriptase* (Invitrogen), se mezcló e incubó a 42 °C durante 50 minutos y se inactivó la reacción elevando la temperatura a 70 °C durante 15 minutos.

Una vez generado el ADN complementario (cADN), se almacenó a -30 °C hasta su uso.

3.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) con SYBR Green

La evaluación de la expresión de genes asociados a la diferenciación osteogénica y adipogénica se realizó empleando la técnica PCR cuantitativa (qPCR).

Para ello utilizamos 2,5 ng/ml de cADN al que se le agregó: la enzima *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad); los *primers* específicos para cada gen a la concentración recomendada para la enzima; y, agua libre de ARNasas y ADNasas. Además de los *primers* para los genes estudiados, se incluyó en cada ensayo el gen endógeno Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GADPH*), para ser utilizado en la normalización de los datos de expresión.

La PCR inició con un ciclo de desnaturalización inicial y activación de la enzima a 95 °C durante 15 segundos. 45 ciclos que incluyeron: la desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos; la alineación a 60 °C durante 30 segundos; la extensión a 95 °C durante 30 segundos; y, una etapa final de *melting curve* de un ciclo a 95 °C durante 1 min. Terminados los ciclos se continua con un ciclo a 55 °C durante 30 segundos y 95 °C durante 30 segundos.

La PCR fue realizada en el equipo *QuantStudio 3* (Thermo Fisher Scientific) donde el producto amplificado se detectó por la emisión de fluorescencia (Ct), el cual se correlacionó con la cantidad de RNA diana expresado.

3.10.4 Análisis de los datos obtenidos de la RT-qPCR

La cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes de interés se calculó utilizando el método comparativo $\Delta\Delta C_t$.

Cuya fórmula fue:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{condición 1}) - \Delta C_t (\text{condición 2})$$

En donde ΔC_t correspondió a la fórmula:

$$\Delta C_t = C_t (\text{gen de interés}) - C_t (\text{gen endógeno})$$

Y el C_t correspondió al valor del punto en el que la curva de expresión del gen cruzó el umbral de fluorescencia. Este umbral se estableció, de acuerdo con las especificaciones del *QuantStudio 3*, en la fase exponencial de la curva de amplificación.

El análisis se realizó para cada muestra en triplicado, una vez normalizado frente a la expresión del gen endógeno. Los valores de C_t para cada reacción se determinó utilizando el *software Design and Analysis* del equipo *QuantStudio 3* (Thermo Fisher Scientific).

3.11 CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN OSTEÓBLASTOS “LIKE”

La caracterización de las células osteoblásticas obtenidas de explantes se llevó a cabo midiendo los niveles de expresión de los genes asociados al metabolismo óseo: i) *ALPL*; ii) factor de transcripción 2 relacionado con el dominio Runt (*RUNX2*); iii) el gen que produce la Proteína secretada ácida y rica en cisteínas, también llamada Osteonectina (*SPARC*); y, iv) el gen que produce la fosfoproteína secretada 1, también llamada Osteopontina (*SPPI*). Y los genes asociados al metabolismo lipídico: i) adiponectina (*ADIPOQ*); y, ii) el gen que produce la proteína de unión a ácidos grasos (*FABP4*).

Los experimentos descritos a continuación, se realizaron tanto en células aisladas a partir de osificación como de tejido control sano.

La diferenciación osteogénica se indujo sometiendo a las células a un medio de diferenciación (medio osteogénico) constituido por, DMEM completo (ver apartado 3.8) suplementado con dexametasona (Dx; Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, β -glicerol fosfato (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mM y ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) a 50 $\mu\text{g/ml}$.

De un subcultivo de osteoblastos “like” (explante-1, pase-1) se realizó un conteo celular (ver apartados 3.8.2 y 3.8.3) para obtener 48.000 células, las cuales se sembraron en una placa de 24 pocillos con medio osteogénico. Cada pocillo correspondió a un *time point* de la diferenciación: i) 7 días; ii) 14 días; y, iii) 21 días. El tiempo cero, correspondió al conteo de 48.000 células de subcultivo, a las que se les extrajo el ARN directamente. Un pocillo extra se sembró con células en el medio de cultivo estándar como control de crecimiento no diferenciado. Las células se incubaron en condiciones de cultivo (ver apartado 3.8), el medio fue remplazado 3 veces por semana y al finalizar cada *time point*, se aspiró el medio de diferenciación del pocillo, se hizo un lavado con PBS (Sigma-Aldrich) estéril y se realizó la extracción del ARN, como se describió en el apartado 3.10.1.

Para determinar los niveles de expresión de genes asociados el metabolismo osteogénico y adipogénico se realizó la retrotranscripción del ARN (ver apartado 3.10.2) y la cuantificación de expresión mediante qPCR en tiempo real (ver apartado 3.10.3); para ello se utilizaron secuencias de *primers* específicos para cada gen de interés (**Tabla 6**) y como gen de control endógeno se utilizó el gen *GAPDH*. El análisis de datos se realizó como se describe en el apartado 3.10.3.

Tabla 6. Secuencias de primers para qPCR SYBR green de genes de metabolismo óseo y lipídico

Metabolismo	Gen	Secuencia
OSTEOGÉNICO	ALPL	Forward - TCTTCACATTTGGTGGATAC
		Reverse - ATGGAGACATTCTCTCGTTC
	RUNX2	Forward - AAGCTTGATGACTCTAAACC
		Reverse - TCTGTAATCTGATACTGTCC
SPARC	Forward - AGTATGTGTAACAGGAGGAC	
	Reverse - AATGTTGCTAGTGTGATTGG	
SPP1	Forward - GACCAAGGAAAACACTACTAC	
	Reverse - CTGTTTAACTGGTATGGCAC	
ADIPOGÉNICO	ADIPOQ	Forward - GGTCTTATTGGTCTAAGGG
		Reverse - GTAGAAGATCTTGGTAAAGCG
	FABP4	Forward - CAAGAGCACCATAACCTTAG
		Reverse - CTCGTTTTCTCTTTATGGTGG
CONTROL ENDÓGENO	GAPDH	Forward - CTTTTGCGTCGCCAG
		Reverse - TTGATGGCAACAATATCCAC

3.12 DETECCIÓN DE ISOFORMAS DE GNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

La identificación, visualización y semi-cuantificación de isoformas de la proteína Gs- α , el principal producto del complejo GNAS, se realizó utilizando el método de *Western Blot*, una técnica que permite la identificación de proteínas específicas mediante el uso de anticuerpos.

3.12.1 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas totales de los diferentes cultivos celulares se realizó utilizando un buffer de lisis de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA; Thermo Scientific) que permitió la extracción de proteínas localizadas en la membrana celular y núcleo. El buffer de lisis se preparó adicionando, en dilución 1:100, un cóctel de inhibidores de fosfatasa y proteasas (Cell Signaling Technology), que evitaron la degradación enzimática de las proteínas.

El proceso de extracción comenzó retirando el medio de cultivo de las placas y se colocaron sobre hielo. Se realizó un lavado con 6 ml de PBS (Sigma-Aldrich) frío para la eliminación de restos de FBS.

Se eliminó el PBS y se adicionó la preparación del buffer de lisis a cada placa (1ml por cada $\sim 5 \times 10^6$ células). Se incubó durante cinco minutos en hielo, agitando ocasionalmente para asegurar la homogenización del buffer sobre la placa.

Se recuperó el lisado celular con ayuda de un raspador de células. El lisado se colectó en un tubo de 1,5 ml y se centrifugó a 14.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y se congeló a -80°C hasta su uso, se evitó lo más posible exponer el extracto de proteínas a ciclos de congelación/descongelación.

3.12.2 Cuantificación de proteínas por método de Bradford

Fue necesario normalizar la cantidad de proteína que hay en los distintos lisados celulares, para ello se realizó una cuantificación de las proteínas totales extraídas. La cuantificación se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford (*Protein Assay*; Bio-Rad) en la que se incluyó una curva de estándares para obtener la concentración final.

Los estándares se prepararon utilizando albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich) en concentraciones conocidas (5; 2,5; 1,25; 0,625 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). El reactivo colorimétrico se diluye una parte del *Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad) en cuatro partes de agua ultrapura, con grado de laboratorio filtrada y purificada por ósmosis inversa (Milli-Q). Se transfirieron 200 μl de

colorante diluido en los pocillos de una placa de 96 pozos. Se prepararon las muestras y estándares por triplicado y se adicionaron a los pocillos correspondientes; tres pocillos se dejaron sin muestra, únicamente el colorante diluido, el cual fue usado como control negativo. Se dejó incubar durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de placas (*Triad Multi Mode Microplate Reader*, Dynex Technologies).

Los datos de absorbancia obtenidos de la curva estándar se graficaron. Se calculó la pendiente mediante la ecuación de la recta ($y = mx + b$), con el coeficiente de determinación R^2 . Se consideró que la curva estaba en condiciones aceptables con R^2 por encima de 0,90. Las absorbancias de las muestras se interpolaron en la curva de estándares con concentración conocida, se normalizaron con respecto a la absorbancia obtenida de la medición de los pocillos de los controles negativos y se obtuvo la concentración de proteína total en μg .

3.12.3 Separación de proteínas por electroforesis SDS-PAGE

Para realizar la separación de proteínas por electroforesis fue necesario normalizar las muestras. Para ello, se realizan las diluciones necesarias que aseguraron que los extractos de cada tipo celular tengan una cantidad de 10 μg de proteína. Al extracto proteico se le adicionó una mezcla de *buffer Laemmli 4X* (Bio-Rad) y 10% de β -mercaptoetanol (Bio-Rad). Se mezcló y se incubó a 95 °C durante cinco minutos.

La separación de las proteínas totales se realizó por electroforesis SDS-PAGE, utilizando un gel prefabricado de poliacrilamida con gradiente de 4–20% *Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels* de 15 pocillos (Bio-Rad).

Se adicionaron las muestras y el marcador de peso molecular (*Ladder Precision Plus Protein All Blue prestained Protein Standards*; Bio-Rad), el gel se colocó en el sistema de electroforesis vertical *Mini-PROTEAN* (Bio-Rad) que contiene una solución de Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris HCl) 25mM, Glicina 0,19M y Dodecilsulfato de Sodio (SDS) 0,01%. Se conectaron los electrodos y la separación se realizó con un voltaje = 200 voltios (V), Intensidad de corriente = 3,0 amperios (A) y una Potencia = 300 watts (W) durante 35 minutos.

3.12.4 Transferencia y bloqueo

Para realizar el inmunomarcaje de proteínas, fue necesario transferir las proteínas del gel a una membrana. Para ello se realizó una electrotransferencia, mediante el sistema automatizado *Trans-Blot Turbo* (Bio-Rad). Se utilizó la membrana para detección por quimioluminiscencia *Immobilon-P* de 0,45 μm (Merck). La activación de la membrana se realizó sumergiéndola en metanol absoluto (PanReac, AppliChem) hasta que cambió de color opaco a transparente. Se realizó un lavado con agua Milli-Q (Millipore) y posteriormente se equilibró la membrana en una solución de transferencia 1X (que se preparó con 200 ml de *buffer* de Transferencia 5X, Bio-Rad; 600 ml de agua Milli-Q, Millipore; y 200 ml de etanol grado biología molecular 98%, Millipore).

Se colocaron en el sistema de transferencia: un set de filtros humedecidos con la solución de transferencia; la membrana activada; el gel con las proteínas separadas; y, otro set de filtros. Se eliminaron las burbujas con un rodillo. Y la transferencia de las proteínas se realizó utilizando condiciones de voltaje de 25 V, intensidad de corriente de 2,5 A durante siete minutos.

Al terminar la transferencia se realizó inmediatamente el bloqueo de la membrana para evitar uniones inespecíficas. Para ello, la membrana se sumergió en buffer 1X TTBS (Tris HCl con 0,1% de Tween-20; Bio-Rad) al que se le adicionó 5% de leche entera en polvo, y se mantuvo a temperatura ambiente en agitación constante durante dos horas.

3.12.5 Inmunodetección

La detección se llevó a cabo utilizando anticuerpos primarios específicos para la proteína GNAS (ab283266, abcam) en una dilución 1:1000, y para la proteína endógena Vinculina (ab130007, abcam) en una concentración 2 µg/ml, ambas preparaciones se realizaron en solución de bloqueo. La membrana se incubó sumergida en la preparación de anticuerpos primarios durante toda la noche (aproximadamente 12 horas) a 4 °C. A continuación, se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno, con solución TTBS.

Se realizó una incubación con anticuerpos secundarios, correspondientes al hospedador de cada anticuerpo primario: *Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)* 0,8 mg/ml (Ref. 111035003, Jackson ImmunoResearch); y, *Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)* 0,8 mg/ml (Ref:115035003, Jackson ImmunoResearch). Ambas a una dilución 1:2.500 en solución de bloqueo. Se incubó la membrana en agitación, a temperatura ambiente, durante una hora. Se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno, con solución TTBS.

La membrana se incubó por tres minutos con la solución reveladora de quimioluminiscencia ECL (*Chemoluminescent HRP substrate*, Luminata Forte; Millipore) y se trasladó al equipo de fotodocumentación ChemiDoc MP (Bio-Rad). Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el *software Image Lab* (Bio-Rad). La semicuantificación de la proteína GNAS se realizó normalizando los valores de intensidad de bits de las bandas detectadas por el *Image Lab* con respecto a las bandas identificadas como control endógeno (Vinculina) utilizando las condiciones estándares del equipo ChemiDoc.

3.13 LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Gs- α MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia (IF) es un método microscópico que permitió la visualización de las proteínas intracelulares y de membrana mediante la unión de anticuerpos específicos a la proteína de estudio y su detección por una segunda unión de un anticuerpo marcado con un fluoróforo. La visualización se realizó utilizando microscopía confocal, el cual además permite la cuantificación de la proteína marcada por la medición de la señal de fluorescencia.

Utilizamos la inmunofluorescencia para visualizar la proteína Gs- α en los cultivos primarios de: i) fibroblastos de piel control (Fb_{Ctrl}); ii) fibroblastos de piel sana de la Paciente1 (Fb_{sano}); iii) fibroblastos de piel adyacente a una osificación de la Paciente1 (Fb_{ady}); iv) osteoblastos “*like*” de hueso control (Ob_{Ctrl}); v) osteoblastos “*like*” de hueso sano de Paciente1 (Ob_{sano}); vi) osteoblastos “*like*” osificación de Paciente1 (Ob_{osif}); vii) pre-adipocitos sanos de Paciente1 (pre-Adp_{sano}) y viii) pre-adipocito adyacente a una osificación de Paciente1 (pre-Adp_{ady}).

Para poder realizar las IF fue necesario adherir las células a un cubreobjetos redondo de cristal, por lo que estos fueron tratados con la proteína fibronectina que permitió unir las células a la superficie de cristal.

3.13.1 Cultivo celular para inmunofluorescencia

Los cubreobjetos redondos fueron colocados en cada pocillo de una placa de 24 pocillos; se radiaron con luz ultravioleta durante 15 minutos. Se realizó un lavado en cada pocillo con PBS estéril, después de aspirar el PBS, fueron incubados con 300-500µl en una solución de fibronectina de plasma bovino (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) en PBS, durante 60 minutos a temperatura ambiente, asegurándonos que cada cubreobjetos quedó en el fondo del pocillo. Se aspiró la solución y se sembraron 30.000 células por pocillo en DMEM completo. Se incubaron en condiciones de cultivo durante 24 horas.

3.13.2 Fijación y permeabilización

La fijación fue un paso de la IF que permitió la conservación de la estructura celular. Por otro lado, la permeabilización de la membrana celular permitió el marcaje de proteínas intracelulares. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se fijaron añadiendo 300µl de paraformaldehído al 4% (Merck) en cada pocillo; se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS frío y se permeabilizaron las células añadiendo a cada pocillo 300µl de una solución de Triton-X100 (Sigma-Aldrich) al 0,02% en PBS frío. Se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS frío y a continuación se llevó a cabo el inmunomarcaje.

3.13.3 Inmunomarcaje

Para el inmunomarcaje se utilizaron los anticuerpos primarios: i) anticuerpo monoclonal recombinante de conejo Anti-GNAS (ab283266, Abcam), a una dilución 1:2000; ii) anticuerpo monoclonal de ratón Anti- α -Tubulina (T6199, Sigma-Aldrich) a una dilución 1:500. Se utilizaron los anticuerpos secundarios: i) Goat anti-Rabbit IgG (H+L) conjugado rojo Texas (T2762, Thermo Fisher) a una concentración 4 µg/mL; ii) Goat anti-Mouse IgG (H+L) conjugado Alexa Flour® 680 (A32723, Thermo Fisher) a una concentración de 4 µg/mL. Todos los anticuerpos se diluyeron en albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich) al 2% en PBS.

Las células adheridas al portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda, se adicionó el anticuerpo primario y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS en agitación con duración de 5 minutos cada uno. Se recolocaron los portaobjetos en la cámara húmeda, se adicionaron los anticuerpos secundarios y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Se repitieron los lavados con PBS en agitación y se montaron los cubreobjetos sobre un portaobjetos que contenía 8µl de medio de montaje antidecoloración *ProLong Gold* con DAPI (Invitrogen), se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) un agente de unión específico al ADN para la visualización de los núcleos. Se dejaron secar durante 16 horas (*over night*) protegido de la luz y se almacenaron a -20 °C, hasta su uso.

3.13.4 Análisis de imágenes

La captura de las imágenes digitales de las inmunofluorescencias se realizó en la plataforma de microscopía confocal del IDIS, utilizando el microscopio confocal Leica TCS-SP8 (Leica Microsystems). La cuantificación de las señales de fluorescencia emitidas por el anticuerpo anti-GNAS se realizó utilizando el software *Image J* [335].

3.14 PRUEBA DE FÁRMACOS EN CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

La HOP es una enfermedad “huérfana” ya que no cuenta con ningún tratamiento para evitar su progresión. En este proyecto se estudió el efecto de los fármacos: Everolimus, Vismodegib, Esclerostina y una triterapia bajo patente EP19382094 del grupo de patologías músculo esqueléticas – E038/IDIS (Rosiglitazona [Rosi], Dexametasona [Dx] e Indometacina [Indo]); los cuales fueron seleccionados por su actividad inhibitoria sobre genes de *pathways* (mTOR, Hh y Wnt) relacionados íntimamente con la osificación heterotópica.

3.14.1 Determinación de dosis de fármacos

Los tratamientos evaluados y las dosis probadas fueron: i) Everolimus (Certican 0,26 mg, Novartis) a dosis de 10000, 1000, 100 y 10 µM; ii) Vismodegib (Erivedge 150 mg, Roche) a dosis de 50, 10, 5 y 1 µM; iii) Esclerostina Recombinante Humana 20µg (Peprotech) a dosis de 100, 50, 10 y 5 ng.

Se sembraron 48.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos para cada dosis de fármaco y por cada *time point* (48 y 72 horas). Se incubaron en condiciones de cultivo durante 24 horas (apartado 3.8), se eliminó el medio de cultivo de las células y se agregó medio de cultivo nuevo al que se le adicionó la dosis de cada fármaco. Se realizó la extracción del ARN (apartado 3.10.1) a las 48 y a las 72 horas.

La cuantificación de expresión génica se realizó mediante qRT-PCR utilizando *primers* específicos para cada gen evaluado (**Tabla 7**) y para un gen endógeno (*GAPDH*). El análisis de datos se realizó mediante el cálculo de la $\Delta\Delta C_t$ como se describió en el apartado 3.10.4. La dosis óptima para los ensayos de diferenciación fue la concentración inhibitoria de cada tratamiento sobre la expresión de los genes involucrados en su ruta de acción.

Tabla 7. Secuencia de primers para genes asociados a *pathways* implicados en la osificación heterotópica

Vía de señalización	Gen	Secuencia
mTOR	mTOR	Forward - TCGCTGAAGTCACACAGACC
		Reverse - CTTTGGCATATGCTCGGCAC
WNT	AXIN2	Forward - AAAGAGAGGAGGTTTCAGATG
		Reverse - CTGAGTCTGGGAATTTTCTTC
Hedgehog (Hh)	GLI1	Forward - AGATGAATCACCAAAAGGG
		Reverse - ATATCACCTTCCAAGGGTTC

3.14.2 Efecto de fármacos en la diferenciación celular

Los ensayos de diferenciación celular permitieron estudiar las diferencias de expresión génica durante todo el proceso, en el momento justo y en el nivel adecuado. Además de estudiar su relación con vías de señalización (*pathways*) y evaluar componentes de transducción de señal intracelular.

Evaluamos el efecto de diferentes fármacos durante la diferenciación osteoblástica en los cultivos primarios aislados de una paciente con HOP, mediante la cuantificación de la expresión de genes asociados el metabolismo óseo y lipídico.

Estos ensayos se realizaron con los primeros subcultivos de los cultivos primarios de osteoblastos “*like*” para salvaguardar su fenotipo y genotipo. Se utilizaron placas de 24 pocillos donde se sembraron 48.000 células en cada pozo. El número de ensayos dependió de los *time points* establecidos para el proceso de diferenciación (7, 14 y 21 días). Las células permanecieron 24 horas en condiciones de cultivo.

Se preparó el medio de diferenciación osteogénico con: medio de cultivo DMEM completo (apartado 3.8) suplementado con Dx (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 nM, ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) 50 $\mu\text{g/ml}$ y β -glicerol fosfato (Sigma-Aldrich) a 5 mM. Se prepararon los fármacos en medio de diferenciación considerando las concentraciones óptimas que obtuvimos en el apartado 3.14.1. En el caso particular de la triterapia, fue cedida por el laboratorio de patologías musculo esqueléticas – E038/IDIS, se utilizó la dosis (Rosi 2 mM, Dx 1 μM e Indo 60 μM) establecida en su patente para ensayos *in vitro*.

Se adicionaron los medios de cultivo suplementados con los respectivos fármacos en los pocillos correspondientes. Se incubaron en condiciones de cultivo durante el tiempo establecido en los *time points* y al cumplirse estos, se realizó la extracción del ARN. Se prepararon las muestras para los análisis de expresión génica utilizando un panel de genes diseñado a medida para la plataforma nCounter (Nanostring; ver apartado 3.5). Los datos obtenidos de estos experimentos fueron normalizados según los criterios de Nanostring y además, con respecto al *background*.

3.15 EFECTOS DEL SUERO DE LAS PACIENTES EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

La diferenciación celular está determinada por señales extracelulares como son hormonas y factores de crecimiento que interaccionan con los receptores celulares desencadenando una respuesta pleiotrópica.

En este trabajo se analizaron los cambios de expresión génica resultado de enfrentar las células osteoblásticas inmortalizadas, a los sueros sanguíneos tanto de las pacientes con HOP como de controles sanos.

La línea celular de osteosarcoma humana SaOS-2 se utilizó como modelo para analizar el efecto de los sueros de pacientes con HOP y pacientes sanos durante la diferenciación osteogénica. Los ensayos se llevaron a cabo cultivando en medio de cultivo completo DMEM F-12 (Sigma-Aldrich, ver apartado 3.8), 58.000 células por pocillo, en una placa de 24 pocillos. Se consideraron el número de células y pocillos necesarios para cada suero a probar y por cada *time point* de la diferenciación (7, 14 y 21 días). Incubamos las células durante 24 horas en condiciones de cultivo. Se adicionó al pocillo correspondiente, el medio de diferenciación celular para SaOS-2 (DMEM-F12 (Sigma-Aldrich); ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) al 50µg/ml; antibiótico (penicilina/estreptomicina; Sigma-Aldrich) al 1%; y, L-glutamina (Sigma-Aldrich) al 1%) suplementado con 5% de los diferentes sueros a testear: i) suero de la Paciente1; ii) suero de la Paciente2; y, iii) *pool* de sueros de 6 controles sanos. Se incubaron en condiciones de cultivo durante los *time points* establecidos para la diferenciación y se prepararon las muestras para los análisis de expresión génica utilizando un panel a diseño para la plataforma n-Counter (Nanostring; ver apartado 3.5).

4. RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO 1. PRESENTACIÓN DEL CASO ÚNICO DE GEMELAS IDÉNTICAS DISCORDANTES CON DIAGNÓSTICO DE HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA*

La consulta clínica de nuestro grupo de investigación ha dado seguimiento desde los cuatro hasta los 11 años de edad (actualidad) a dos gemelas idénticas diagnosticadas con HOP. En este capítulo se describe tanto el seguimiento clínico, analítico y farmacológico realizado a ambas gemelas.

4.1.1 Antecedentes personales y familiares. primeros signos clínicos de las gemelas

Las gemelas idénticas nacieron pretérmino a las 31 semanas de gestación, sin necesidad de procedimientos de reanimación y sin anomalías ni deformidades en la examinación clínica. Después de las diez semanas de vida, una de las gemelas (Paciente1) presentó pápulas subcutáneas duras en ambas piernas. El diagnóstico inicial fue necrosis de grasa subcutánea, sin embargo, en poco tiempo aparecieron nuevas lesiones, las cuales se fusionaron en placas óseas que progresaron a tejidos profundos que impedían su movilidad. Durante el mismo lapso, la otra gemela (Paciente2) desarrolló tres mínimas pápulas subcutáneas que permanecieron estacionarias durante varios años.

No existen antecedentes familiares de ninguna enfermedad ósea. La madre sufre de vitíligo, hipotiroidismo (tratado con levotiroxina) y migraña. El padre presentó calcificaciones bilaterales, desarrolladas por desgarró del tendón de Aquiles. No existe consanguinidad conocida en la familia.

4.1.2 Diagnóstico genético

Ante la sospecha de una enfermedad osificante de tejidos profundos, en concreto de HOP, debido a la evidencia de osificación intramembranosa y la ausencia tanto de resistencia hormonal como de anomalías morfológicas, las gemelas fueron referidas a la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica para la realización de una prueba diagnóstica genética. Ambas gemelas presentan la misma mutación heterocigota inactivante en el exón 7, que consiste en una delección de 4 pb (GAGT) en el gen *GNAS* (n565-568; 20q13), que, considerando la ausencia de historia familiar de la enfermedad, sugiere una mutación de *novo*, confirmando el diagnóstico de HOP en ambas gemelas.

Se analizaron los valores de IBD, en el que se determinó que los perfiles genéticos de ambas pacientes fueron compatibles con una relación de gemelos o muestras provenientes de la misma fuente biológica [336], según la prueba de Lee [337] (**Figura 20**). Esta relación fue estadísticamente significativa (P-valor $<10^{-16}$ para todas las comparaciones por pares). Se

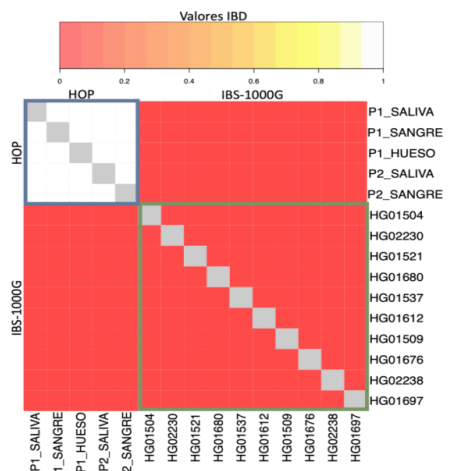


Figura 20. Heatmap de los valores de identidad por descendencia (IBD)

Perfiles de genoma por pares de muestras de las pacientes con HOP, codificadas como Paciente1 y Paciente2; y, perfiles de españoles del proyecto 1000 genomas (IBS-1000G) [338]. Con permiso de: *Creative Commons Attribution License*

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monochorionic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

obtuvieron valores de IBD para todas las comparaciones de un total de 715.195 SNPs. Nuestros análisis indican que ambas hermanas son genéticamente idénticas [338].

4.1.3 Progresión de la enfermedad*

Desde la aparición de los primeros síntomas y el diagnóstico de las pacientes, la diferencia en el curso clínico entre ambas gemelas ha sido evidente. La progresión acelerada de la

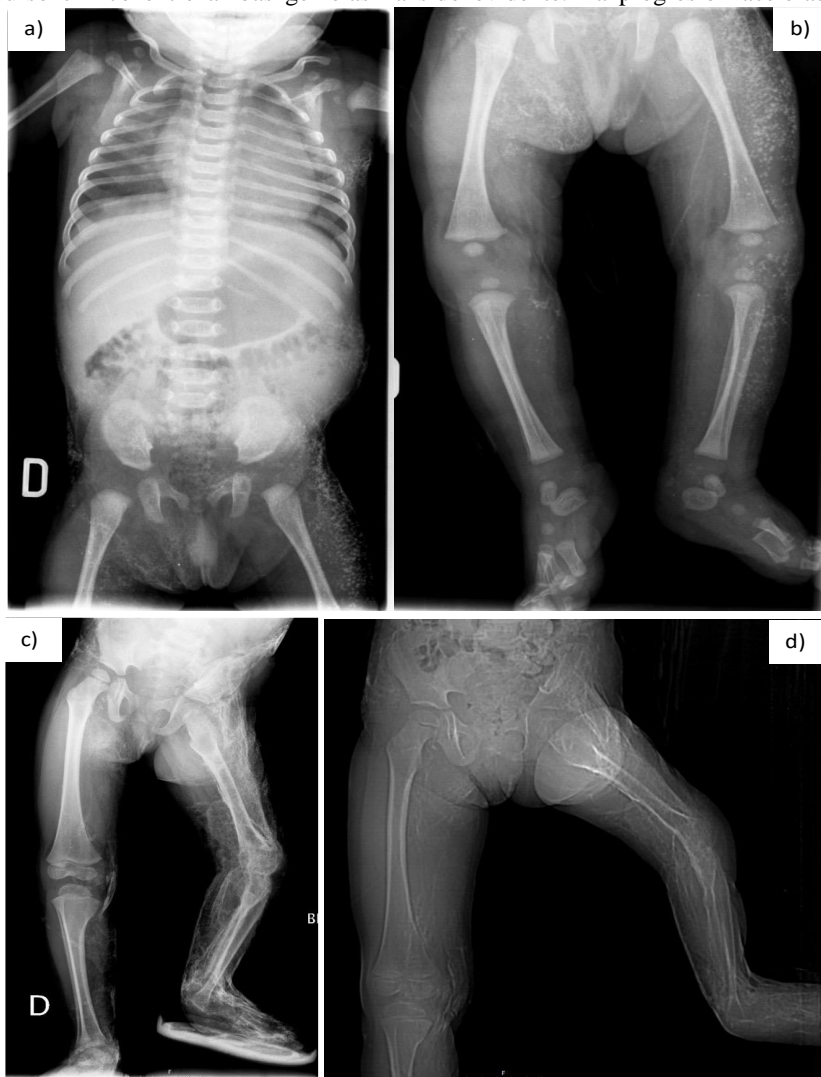


Figura 21. Imágenes cronológicas de la progresión en la Paciente 1.

a y b) Serie ósea completa correspondiente al año 2011, c) Radiografía computarizada de miembros inferiores correspondiente al año 2013, d) Tomografía computarizada de extremidades, correspondiente al año 2014.

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monozygotic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

enfermedad en la Paciente1, desde los primeros síntomas (*Figura 21a, 21b*) derivó en la anquilosis de la pierna izquierda; calcificación de tejidos profundos en la pierna derecha; abdomen; región subescapular; y, tejido adiposo de ambas fosas ilíacas (*Figura 21c, 21d*). Mientras que la Paciente2 no mostró progresión de la enfermedad durante los primeros años y en la actualidad, tan solo presenta tres placas óseas móviles estables en el pterión derecho, brazo derecho y pie izquierdo.

Durante la primera evaluación por parte de nuestra consulta médica se realizó una evaluación de los marcadores óseos séricos en ambas gemelas. Los valores del factor de crecimiento óseo (IGF-1, por sus siglas en inglés) se observaron alterados en la Paciente1, con niveles inferiores con respecto al rango de la normalidad y en contraste con los marcadores de formación ósea BAP, PINP y OC, que se encontraron elevados. Los marcadores relacionados con reabsorción ósea (β -CTX), marcadores de mineralización ósea (calcio, fósforo y vitamina D), la función tiroidea (PTH y TSH por sus siglas en inglés) y marcadores de procesos de autoinmunidad (autoanticuerpos) permanecieron dentro de los valores normales.

En la Paciente2 todos los marcadores analizados permanecieron dentro del rango de la normalidad. (*Tabla 8*)

Tabla 8. Parámetros bioquímicos y hematológicos de las Paciente1 y Paciente2

Parámetros bioquímicos y hematológicos	Rango normal	Paciente1	Paciente2
Factor de crecimiento insulínico 1 [IGF-1] (ng/ml)	49 - 327	39,7	56,2
Fosfatasa Alcalina Ósea [BAP] (mcg/l)	41 - 134	236	122
Propéptido amino-terminal del colágeno tipo I [PINP] (ng/ml)	277 - 824	853,6	666,7
Telopéptido beta carboxi-terminal del colágeno tipo 1 [β -crosslaps o β -CTX] (ng/ml)	0,57 - 1,84	1,71	1,29
Calcio sérico (mg/ml)	9,2 - 10,3	10,2	10,3
25hidroxi-vitamina D (ng/ml)	12 - 54	25	21
Fosfato iónico (mg/dl)	3,5 - 5,5	3,9	5
Osteocalcina (ng/ml)	2.8 - 41	47,2	25,4
Hormona Paratiroidea [PTH] (pg/m)	9 - 59	35	36
Hormona Estimulante Tiroidea [TSH] (mIU/l)	0,35 - 5,50	1,92	2,52
Autoanticuerpos			
Anticuerpos Antinucleares [ANA]		Negativo	Negativo
Anticuerpos Antimitocondriales [AMA]		Negativo	Negativo
Anticuerpos Anticitoplasma de Neutrófilo [ANCA]		Negativo	Negativo
Factor Reumatoide [RF] (UI/dl)	35 - 60	<35	<35
Anticuerpos Anti-Smith [A-Sm]		Negativo	Negativo

Las lesiones osificadas aumentaron de forma acelerada en tamaño y cantidad (*Figura 22*). Dichas lesiones desarrolladas en tejido subcutáneo fueron analizadas por el Servicio de Anatomía Patológica del CHUS y clasificadas como osificaciones de tipo intramembranoso

localizadas a nivel dérmico profundo e hipodermis separadas por tejido adiposo (**Figura 23**). La formación de osificaciones con patrones de mosaico característicos de la HOP y su progresión, se pueden apreciar en las **Figuras 21, 24 y 25** obtenidas cronológicamente desde la primera visita de la Paciente1 a nuestra consulta, hasta la actualidad.

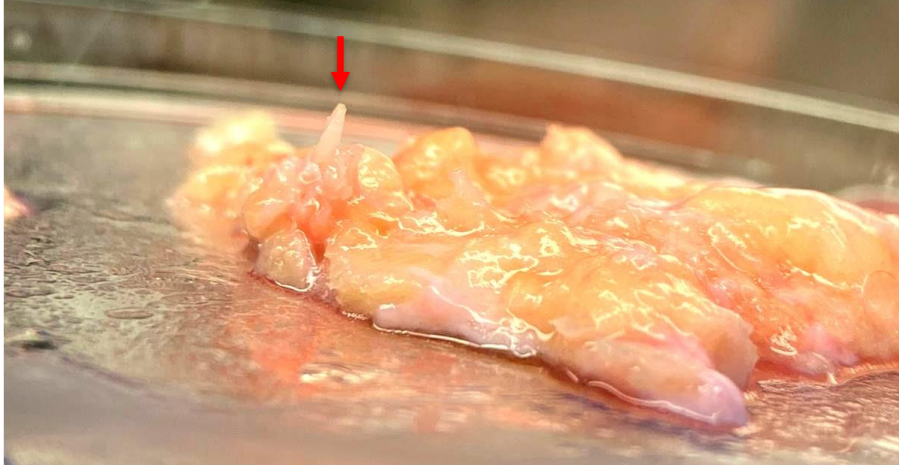


Figura 22. Tejido de resección de piel de una zona con osificación. Se muestra la pieza con la epidermis hacia abajo y la dermis hacia arriba. La flecha muestra una osificación con crecimiento de epidermis hacia dermis

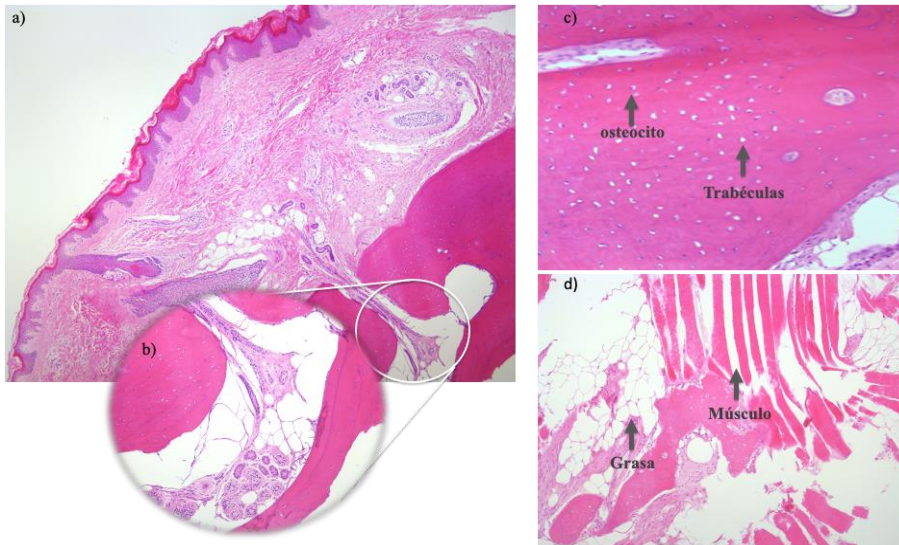


Figura 23. Histologías con tinción hematoxilina-eosina (HE) de tejido subcutáneo osificado de Paciente1. a) Panorámica de tejido cutáneo con extensa osificación a nivel dérmico profundo e hipodermis, aumento 40X; b) Trabéculas óseas de pozos variable separados por tejido adiposo, se incluye glándula sudorípara, aumento 100X; c) Tejido óseo maduro con mineralización, se observan osteocitos dentro de trabéculas, aumento 200X; d) Osificación integrada en músculo, rodeada de tejido adiposo, aumento 40X. Imágenes obtenidas del servicio de Anatomía Patológica del CHUS por el Dr. José Ramón Antúnez López

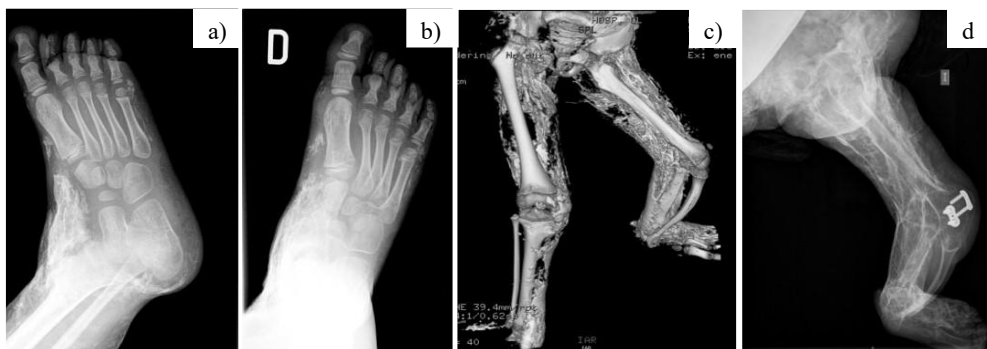


Figura 24. Imágenes cronológicas de la progresión en la Paciente1
 a y b) Tomografía computarizada (TC) del pie izquierdo, año 2015, c) TC de extremidades, año 2016,
 d) radiografía digital del fémur, año 2018



Figura 25. Imágenes cronológicas de la progresión en la Paciente1 (2ª parte)
 a) Tomografía computarizada (TC) de extremidades, año 2019; b) TC completa, año 2021

4.1.4 Interacción del sistema inmunitario y el metabolismo óseo (osteoinmunidad) en la HOP

Para evaluar y comparar el perfil osteoinmune de las pacientes con HOP y de controles sin HOP, se cuantificaron los niveles séricos de siete citoquinas inmunológicas involucradas en la homeostasis ósea. Se observó una desregulación en un grupo de 4 citoquinas relacionadas con osteoinmunidad en las pacientes con HOP con respecto al grupo control, sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos. La Paciente1 mostró niveles disminuidos de los marcadores MCP.1 y RANTES/CCL5 (*Figura 26a, 26b*), mientras que en la Paciente2 se observaron niveles incrementados de las citoquinas PDGF.AA y MIP-1 beta (*Figura 26c, 26d*). No se observaron diferencias entre los perfiles de citoquinas de la Paciente1 y Paciente2. El resto de las citoquinas tuvieron niveles similares entre los grupos. (*ANEXO 3*).

Por otro lado, se analizaron 13 marcadores séricos relacionados con el recambio óseo. Observamos un perfil diferencial significativo en seis de los marcadores cuando comparamos las pacientes con HOP y los controles sin HOP. En la Paciente1 observamos niveles incrementados de OPN (P-valor = 0,048; *Figura 27a*) y niveles disminuidos de la citoquina TNF- α (P-valor = 0,019; *Figura 27b*) comparado con los controles sin HOP. Mientras que la Paciente2 mostró niveles séricos disminuidos de los marcadores DKK1 (P-valor = 0,008; *Figura 27c*) y OC (P-valor = 0,004; *Figura 27d*), y niveles incrementados de Leptina (P-valor = 0,004; *Figura 27e*).

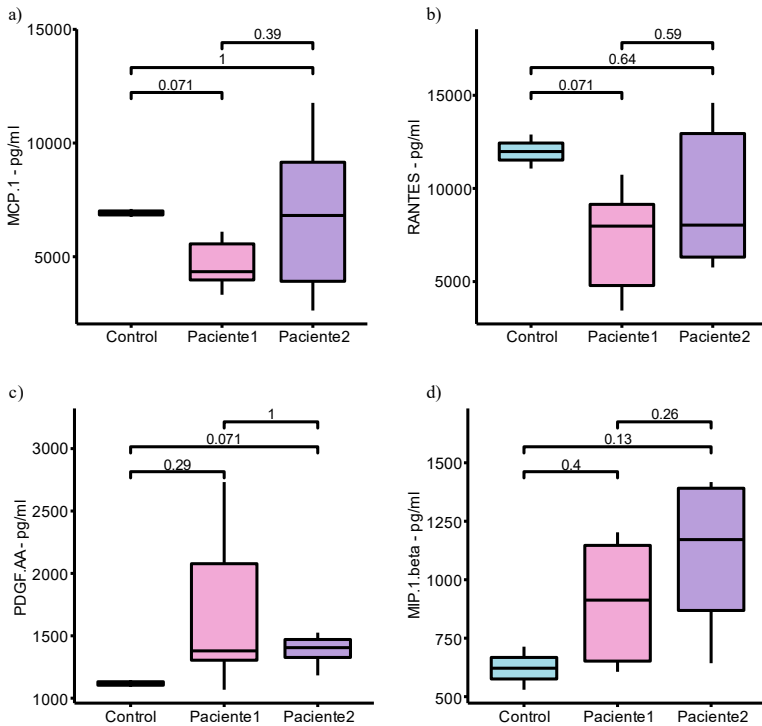


Figura 26. Marcadores de osteoinmunidad en suero de pacientes con HOP vs Controles
 Representación de los niveles séricos de las citoquinas: a) Proteína quimioatrayente de monocitos (MCP.1/CCL2); b) Ligando 5 de quimiocina (RANTES/CCL5); c) Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas PDGF.AA; d) PDGF.BB; obtenidos mediante inmunoensayos MILLIPLEX

Cuando comparamos los niveles de citoquinas entre la Paciente1 con la Paciente2 identificamos niveles incrementados en la Paciente1 de DKK1 (P-valor = 0,040; **Figura 27c**) y OC (P-valor = 0,002; **Figura 27d**). Por otro lado, la Paciente2 tiene niveles incrementados con respecto a Paciente1 en TNF- α (P-valor = 0,006; **Figura 27b**), Leptina (P-valor = 0,008; **Figura 27e**) e IL-6 (P-valor = 0,010; **Figura 27f**). En el resto de las citoquinas no se observaron diferencias significativas (**ANEXO 4**).

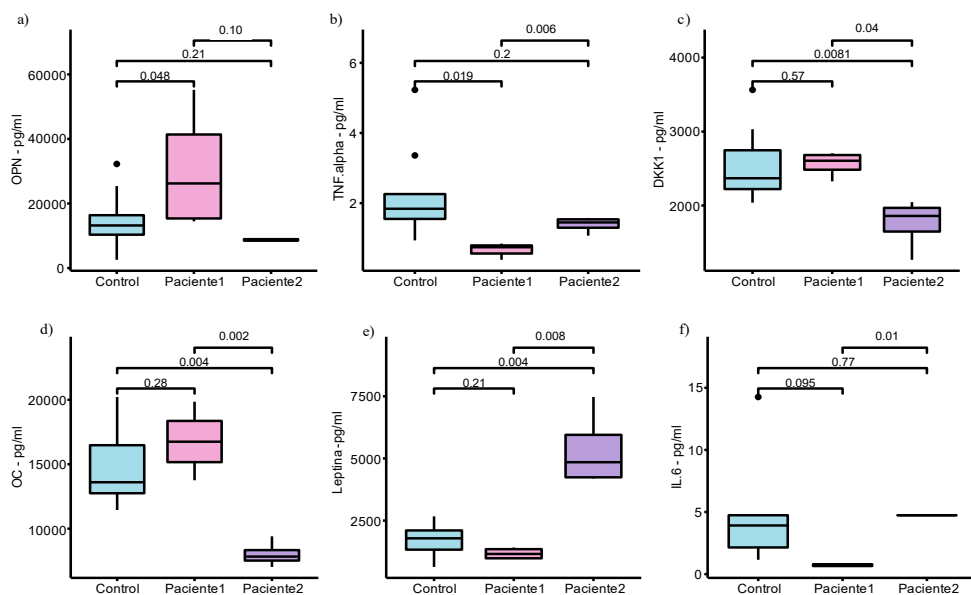


Figura 27. Medición de marcadores séricos relacionados con el metabolismo óseo
a) Osteopontina (OPN); b) Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α); c) Proteína dickkopf-1 (DKK1); d) Osteocalcina (OC); e) Leptina; f) Interleucina 6; obtenidos mediante inmunoensayo MILLIPIX

4.1.5 Protocolo de tratamiento farmacológico*

La rápida progresión de la enfermedad en la Paciente1 que evolucionaba condicionando cada vez más su movilidad precisó de una exhaustiva revisión de posibles opciones terapéuticas registradas para HOP y se diseñó un protocolo de tratamiento exclusivo para la paciente (**Tabla 9**).

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monochorionic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseus Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

Tabla 9. Resumen de las pautas terapéuticas usados en la Paciente1

Fármaco	Dosis	Mecanismo	TD	Efecto adverso	Causa de discontinuación	Ref.
Mecasermina (rhIGF-1)	0,04 mg/día	rhIGF-1	15	No	Marcadores séricos empeorados; misma clínica.	[339,340]
Naproxeno	100mg	AINES	40	Úlceras aftosas	Úlceras aftosas	[341]
Treteronina tópica	0,10% 0,025%	Retinoide: estimulación a nivel transcripcional de la expresión de Gs- α	10	Erupción roja e hinchada en las zonas aplicadas	Crecimiento de osificación sobre la escápula	[342-344]
Acitretina oral	10 mg/ día	Retinoide: estimulación a nivel transcripcional de la expresión de Gs- α	90	No	Coalescencia de espigas óseas en la espalda y progresión de la osificación en la escápula izquierda, así como aparición de nuevas puntas osificadas rodeando la osificación del abdomen.	[345]
Pamidronato	2,5mg/Kg	Bifosfonato: disminuye la liberación de calcio, bloquea la mineralización de la matriz ósea.	3	Empeoramiento de la mialgia y astenia; aparición de fiebre baja	Manifestaciones de progresión de HOP	[346]
Itroconazol	6,6mg/q.d 9,5mg/q.d	Antifúngico: actúa como potente supresor de la vía de señalización Hh	90 30		Regresión de los marcadores séricos de formación de hueso a niveles previos y ausencia en la progresión de la enfermedad	[347]
Metilprednisolona	20mg/kgq.d Retirada gradual	Hormona corticosteroide	5 180		Ausencia de mejora clínica en la progresión de la enfermedad a pesar de la reducción de marcadores óseos después de iniciar la pauta.	[114,348]
Indometacina	3mg/Kg (b.i.d) 4mg/Kg (b.i.d)	AINES	180		Progresión de la enfermedad, finalización de tratamientos incluidos en nuestro protocolo.	[349,350]
Everolimus	4.5 mg/m2 /q.d 5-9mg/m2 /q.d	Inhibidor de la vía mTOR	199	Aftas bucales	Progresión en el crecimiento de osificaciones y aparición de nuevas osificaciones nuevas.	[343,348]
Triterapia						
Pioglitazona	1 mg/Kg/q.d	Inhibidor de vía Wnt	1	Epigastralgia		
Indometacina	75mg/q.d	AINES	1			
Dexametasona	0,08mg/Kg/q.d	Análogo de hormona corticosteroide	1			
Pioglitazona Dexametasona	45 mg/q.d 0,08mg/Kg/q.d Retirada gradual al 25% c/5 días		53	Mala cicatrización de heridas quirúrgicas	Progresión en el crecimiento de osificaciones antiguas y aparición de nuevas placas óseas a nivel abdominal y miembro inferior derecho.	[351]

Abreviaturas: TD: tiempo de administración (días); b.i.d, *bis in die* (dos veces al día); q.d, *quaque die* (una vez al día) [352].

Con permiso de: Creative Commons Attribution License.

4.1.5.1 Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con rhIGF-1*

La primera línea de tratamiento que se utilizó fue la mecasermina (rhIGF-1), se administraron dos dosis de 0,04 mg/kg por vía subcutánea diariamente durante dos semanas para regular los niveles persistentemente bajos que presentó desde su nacimiento la Paciente1 y como nuevo enfoque terapéutico, basándonos en su papel como regulador de la osteoclastogénesis y la reabsorción ósea [353].

No se observaron efectos adversos y fueron evaluados los niveles de marcadores óseos y parámetros analíticos de rutina. Los valores séricos de rhIGF-1 se normalizaron (valor máximo =196 al día 15 de tratamiento) sin producir cambios en la progresión de la enfermedad. Los valores del marcador de recambio óseo CTX aumentaron en un 10% (de 1,71 ng/ml a 1,87 ng/ml), mientras que los niveles del marcador de proliferación de osteoblastos PINP aumentaron en un 30% (de 853,6 ng/ml a 1.177 ng/ml) (**Figura 28**). Al no haber mejoría en los parámetros clínicos, se suspendió el tratamiento.

4.1.5.2 Evaluación de la Paciente1 durante el Tratamiento con retinoides*

Después de retirar el IGF-1 y el naproxeno, se inició la aplicación de tretinoin tópica 0,10% en tres zonas: sobre la osificación en la zona de la escápula derecha y dos zonas pequeñas localizadas sobre pequeñas osificaciones en la pared abdominal. A pesar de proteger las zonas del sol, la Paciente1 desarrolló un exantema eritematoso y edema en las zonas expuestas al tratamiento.

Se disminuyó la dosis del tratamiento tópico al 0,025% pero los efectos adversos continuaron y la osificación heterotópica sobre la escápula aumentó de tamaño.

Dos semanas después, se cambió la administración del tratamiento por isotretinoína oral. Tuvo una buena tolerancia al tratamiento oral, sin registrarse efectos secundarios. Después de un mes de tratamiento los niveles de PINP disminuyeron a 570 ng/ml y CTX hasta 1,2 ng/ml (**Figura 28**). Sin embargo, tras tres meses se retiró el tratamiento por no observar mejoría clínica ni evitar/decelerar la progresión de la enfermedad, ya que en ese periodo de tiempo se observó coalescencia de pequeñas osificaciones a nivel dorsal, la osificación de la escápula izquierda progresó y aparecieron nuevas osificaciones alrededor de las ya formadas en la pared abdominal.

4.1.5.3 Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con bifosfonatos*

La siguiente opción terapéutica fue la administración de pamidronato vía intravenosa durante 3 días con una dosis acumulativa de 2,5 mg/kg. La administración del tratamiento fue mal tolerada por la Paciente1 con incremento de las mialgias, astenia y aparición de febrícula. Además, se observaron alteraciones hidroelectrolíticas que incluían grados leves de hipopotasemia e hipocalcemia, así como elevación transitoria de las enzimas hepáticas. Después de cinco semanas de tratamiento, se observó disminución en los niveles de PINP (227 ng/ml) y CTX (0,31 ng/ml) (**Figura 28**), pero con progresión en las manifestaciones de la enfermedad, por lo que se decidió la discontinuar el tratamiento.

Se continuó el protocolo de tratamiento con la administración de Itraconazol con una dosis única diaria de 100 mg (6,6 mg/kg/día). Después de tres meses de tratamiento y tras observar una mantenida actividad osificante y brote de la enfermedad, la dosis se aumentó a 150 mg (9,5 mg/kg/día). La duración total del tratamiento con Itraconazol fue de cuatro meses, durante los cuales los marcadores de formación ósea regresaron a los niveles previos al tratamiento y no se

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monochorionic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseus Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

observó mejora clínica en la progresión de la enfermedad. En ese periodo de tiempo se realizó exéresis de placa abdominal izquierda, debido al dolor provocado al sentarse.

4.1.5.4 Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con corticoides*

La siguiente línea de tratamiento consistió en la administración de metilprednisolona vía intravenosa durante 5 días en dosis elevadas (20mg/kg/día), disminuyendo posteriormente la dosis gradualmente por un periodo de 6 meses.

Inicialmente se observó la disminución del marcador PINP (98,1 ng/ml) siendo éste el nivel más bajo durante todo su seguimiento y el aumento del marcador CTX (2,1 ng/ml) (**Figura 28**). En los análisis siguientes los valores de ambos marcadores volvieron a los niveles basales habituales. Durante ese periodo de tiempo, se realizó una densitometría ósea observándose una importante osteopenia de las vértebras lumbares (-9,22 desviaciones estándar), además de presentar un brote de la enfermedad definido por la aparición de osificación en la zona de los isquiotibiales derechos, por lo que no se consideró repetir la administración del corticoide. Debido al aumento de dolor, se sustituyó el naproxeno por indometacina un mes antes de la interrupción del corticoide.

4.1.5.5 Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINES)*

Se inició el tratamiento con Indometacina con una dosis de 3 mg/kg/dos veces al día. Durante ese periodo se identificaron áreas no calcificadas, pero dolorosas, y similares a tumoraciones en los músculos de la parte posterior de la pierna; lo que sugirió una osificación de tipo endocondral característica de fibrodisplasia osificante progresiva (FOP). Además, se observó la progresión de algunas pápulas subcutáneas a placas de osificación con la retracción de la piel en el abdomen y la escápula. Esas osificaciones se convirtieron en hueso maduro seis meses más tarde.

Se evitaron las extracciones de sangre con la finalidad de minimizar la interferencia con las actividades diarias de la Paciente1. En este periodo y tras 1 año de la exéresis de la osificación abdominal (durante el tratamiento con Itraconazol), se observó la aparición de lesiones osificantes a lo largo de la cicatriz. Además, la Paciente1 fue sometida a una cirugía ortopédica con la finalidad de detener la anquilosis de la rodilla aún funcional.

Durante 14 meses de tratamiento con Indometacina la Paciente1 presentó dos periodos de brote y recurrencia de osificación debajo de las zonas cicatrizales de la incisión de una exéresis previa.

Los valores analíticos de los marcadores óseos (PINP y CTX) durante la administración de los distintos tratamientos a la Paciente1 se representan en la **Figura 28**.

Durante el protocolo de tratamiento, la Paciente1 presentó datos de infección en diversas ocasiones, especialmente en zonas donde las espigas de osificación desgarraron la piel (pie izquierdo) produciendo necrosis y ulceración de la lesión osificada. Además, en alguna ocasión fue ingresada para la administración de antibióticos intravenosos por infección post quirúrgica. La analgesia ha tenido que ir aumentando con respecto al tiempo debido a la progresión de la enfermedad.

El hipermetabolismo ha provocado la anquilosis de la pierna izquierda y la retracción en el miembro inferior derecho. El percentil de talla se ha ido alejando del normal para su edad con

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monozygotic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

la progresión de la enfermedad. A pesar de tener momentos anímicamente más complicados, la Paciente1 ha mantenido una disposición alegre.

Tras el fracaso del tratamiento con corticosteroides, los padres y el equipo médico acordaron suspender las extracciones de sangre quincenales y seguir la evolución en función de los parámetros clínicos, para reducir intervenciones y visitas al hospital, minimizando así la interferencia con las actividades diarias.

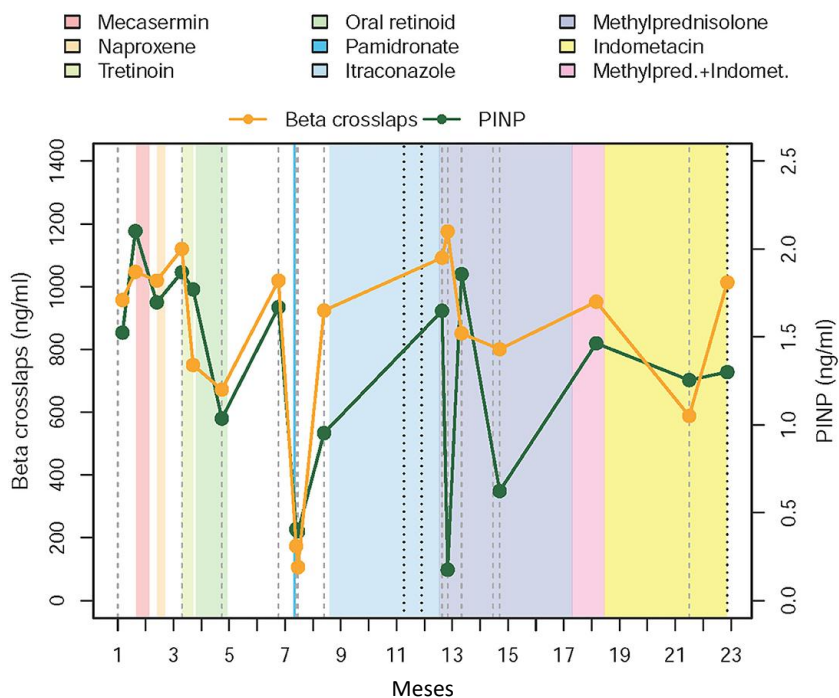


Figura 28. Cronograma de tratamientos recibidos y evolución de la enfermedad en el Paciente1. Niveles de PINP y CTX (Beta-crosslaps) obtenidos en las 4 semanas previas al inicio de la primera intervención terapéutica (administración de Mecasermina) correspondiente al inicio del segundo mes. PINP: propéptido amino terminal del colágeno tipo I [352]. Con permiso de: *Creative Commons Attribution License*

La progresión de la enfermedad en la Paciente1 se muestra en la **Figura 29** donde se observan osificaciones en el miembro inferior derecho, especialmente sobre la superficie medial de la tibia, esta osificación afecta parte del tobillo derecho y de la dermis sobre los aductores. Se evidencia la asimetría entre los miembros inferiores (con progresión constante), así como anquilosis tanto de rodilla como del tobillo izquierdo.

4.1.5.6 Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con Everolimus.

Dado que la Paciente1 no demostró mejora con el primer protocolo establecido de tratamientos compasivos y la enfermedad seguía progresando con complicaciones cada vez más



Figura 29. Fotografía de las afectaciones en la Paciente1 como un fenotipo extremo de HOP[352]. Con permiso de: *Creative Commons Attribution License*

incapacitantes; el grupo médico con la aceptación de los padres optaron por la administración de Everolimus, un inmunosupresor con actividad inhibitoria de la vía de señalización mTOR, implicada en la diferenciación de MSCs a osteoblastos.

El Everolimus fue administrado por vía oral antes de las comidas (14:00) a una dosis de 4,5 mg/m² y una dosis de mantenimiento de 5-9 mg/m² ajustando la dosis para llegar a la concentración óptima en sangre. El periodo de tratamiento fue de 254 días (36 semanas) y la continuidad del tratamiento se evaluó considerando su impacto negativo en la progresión de la enfermedad y la inexistencia de efectos terapéuticos inadecuados o efectos adversos importantes. La estimación de la eficacia a largo plazo del Everolimus se realizó mediante una exhaustiva inspección clínica que incluía la evaluación de la mitigación del crecimiento de las placas existentes o la aparición de lesiones de nueva formación.

En paralelo, se administró terapia profiláctica con cotrimoxazol para sopesar el efecto inmunomodulador del Everolimus. Se suspendió a los 33 días una vez se demostró que no era necesario. Se realizó un completo seguimiento clínico y bioquímico de la enfermedad durante el período de administración del tratamiento.

En general, la Paciente1 toleró bien el tratamiento con Everolimus, presentando como único efecto adverso úlceras de tipo aftas orales cuando los niveles de Everolimus en sangre eran más altos.

No se observó ningún efecto secundario reportado por la ficha técnica del tratamiento como es inmunosupresión, neumonitis no infecciosa, hipersensibilidad o insuficiencia renal, sin embargo, al día 28 el tratamiento fue interrumpido como medida preventiva (del día 65 al día 93) debido a una infección respiratoria.

Durante el tratamiento con Everolimus la progresión de la enfermedad se mantuvo estable en general, clínicamente se observaron el desprendimiento menor de las placas de osificación previas al tratamiento con Everolimus y la aparición de pequeñas osificaciones nuevas. En el día 217 de tratamiento se realizó una exéresis programada de tres placas de osificación existentes previas al tratamiento. El día 233 se observó una aceleración en la progresión de la enfermedad con un incremento significativo de las lesiones osificantes (**Figura 30**).

Los parámetros analíticos fueron evaluados en diferentes momentos durante el tratamiento con Everolimus. En el día 197 se observó hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Se determinó la existencia de una correlación significativa entre los niveles de Everolimus en sangre y los niveles de glucosa ($r^2 = 0,720$; P-valor = 0,002) y ácido úrico ($r^2 = -0,502$, P-valor = 0,040), sin embargo, los resultados no fueron significativos al realizar el ajuste de efectos múltiples Bonferroni (**ANEXO 5**).

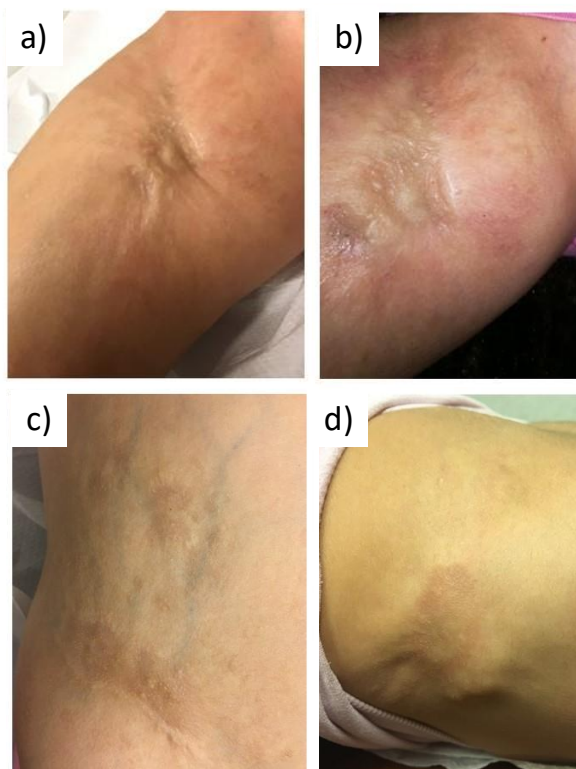


Figura 30. Imágenes clínicas de la progresión de la HOP en Paciente1
(a) antes y b) después del agravamiento alrededor del día 233 en la ingle derecha, (b) nuevas calcificaciones ectópicas en el abdomen y (c) escápula izquierda

4.1.5.6.1 Monitorización de marcadores óseos durante el tratamiento con Everolimus

Los niveles de BTMs séricos (ALP, CTX y PINP) se correlacionaron negativamente con los niveles séricos de Everolimus, siendo que cuando los niveles del tratamiento aumentaban, los niveles de los BTMs disminuían, y viceversa. En un breve periodo de disminución en los niveles séricos de Everolimus (día 93) se observó un incremento en los marcadores óseos (**Figura 31**).

Se observó una correlación significativa en los marcadores óseos CTX ($r^2 = -0,576$, P-valor = 0,016) y PINP ($r^2 = -0,598$, P-valor = 0,011), mientras que la correlación con ALP no fue estadísticamente significativa ($r^2 = -0,268$, P-valor = 0,298) (**Figura 31**).

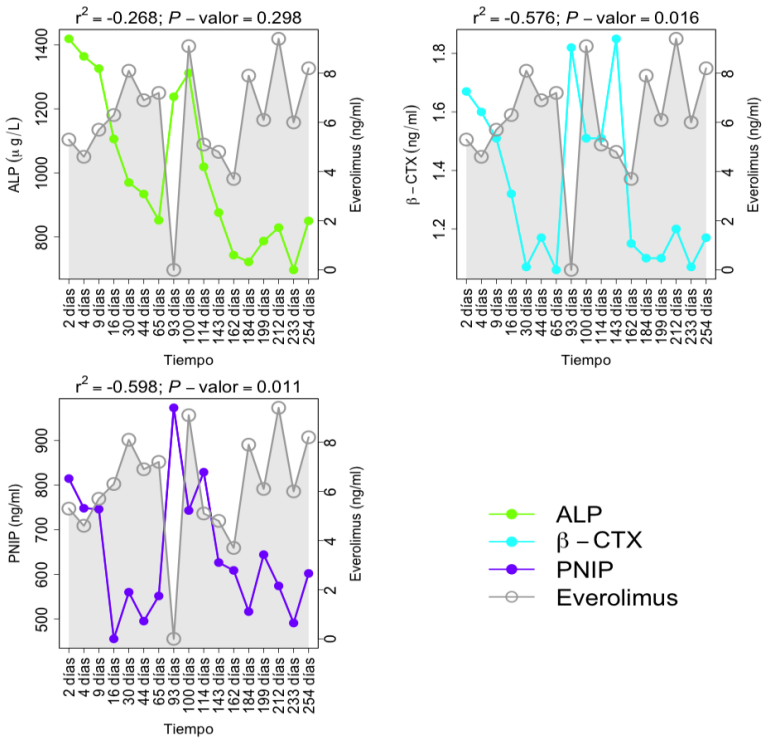


Figura 31. Seguimiento de biomarcadores de actividad de recambio óseo (BTM) durante el tratamiento inmunosupresor con Everolimus

ALP se expresa en µg/l; Los niveles de β -CTX, PINP y Everolimus se miden en ng/ml. El coeficiente de correlación de Pearson y el correspondiente P-valor se muestran en cada comparación

En contraste con los BTMs, los marcadores relacionados con el metabolismo óseo únicamente la PTH mostró una correlación positiva significativa ($r^2 = 0,622$, P-valor = 0,041) con respecto a los niveles de Everolimus en sangre. Se observó una correlación negativa entre los marcadores de inhibición de la vía Wnt: DKK1 y SOST ($r^2 = -0,458$, P-valor = 0,157; $r^2 = -0,348$, P-valor= 0,294; respectivamente), sin embargo, la diferencia no fue significativa. Los niveles de OC ($r^2 = 0,519$, P-valor = 0,102), OPG ($r^2 = 0,179$, P-valor = 0,598) y OPN ($r^2 = 0,252$, P-valor = 0,456) mostraron una correlación positiva, pero con un nivel de significación por debajo del umbral nominal (**Figura 32**).

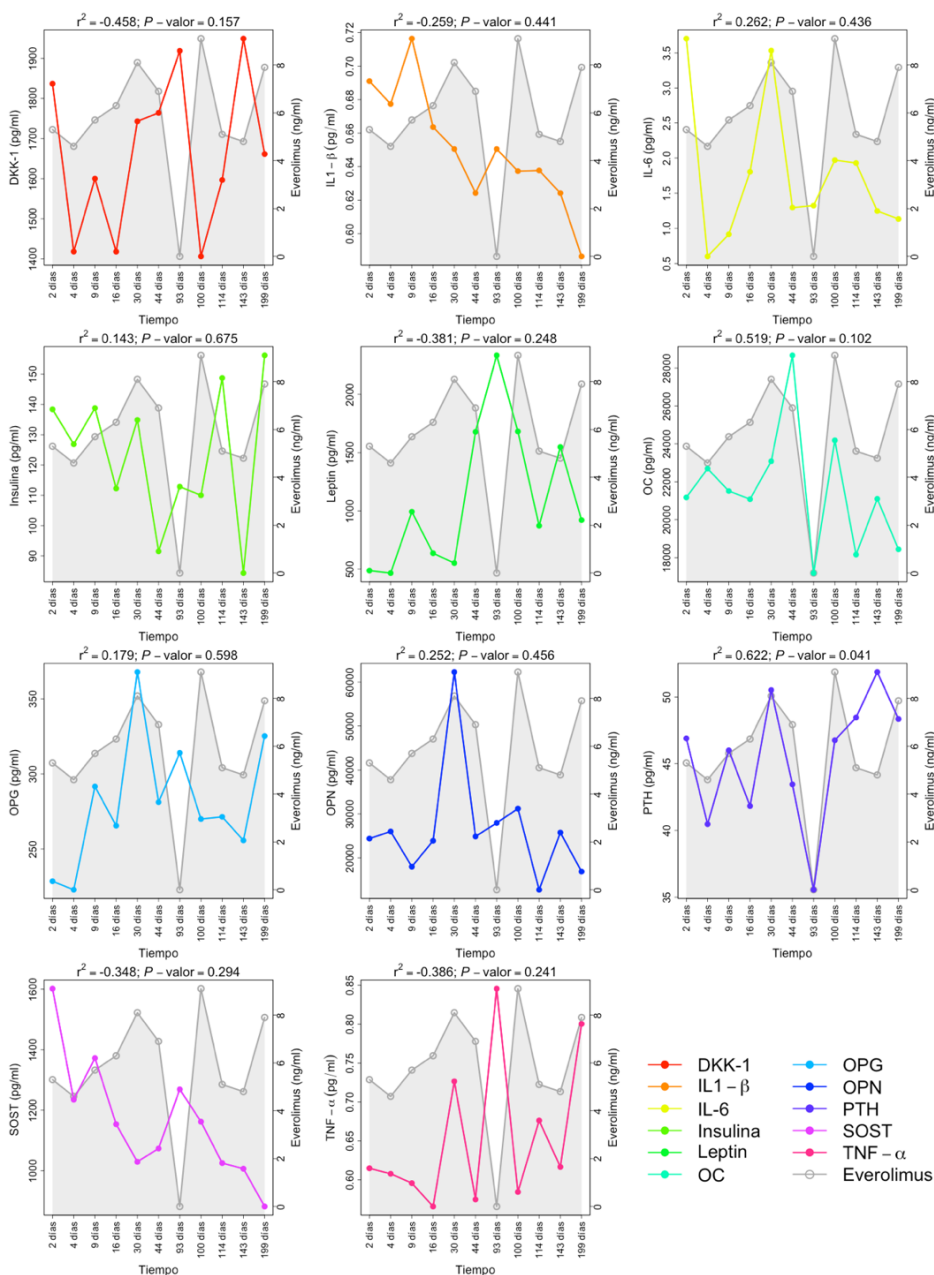


Figura 32. Seguimiento de las citocinas como biomarcadores relacionados con el metabolismo óseo durante el tratamiento con Everolimus. Se analizaron: DKK-1, IL1- β , IL-6, Insulina, Leptina, OC, OPG, OPN, PTH, SOST y TNF- α . El coeficiente de correlación de Pearson y el correspondiente P-valor se muestran en cada comparación.

4.1.5.7 Evaluación de la Paciente1 durante el tratamiento con una triterapia (pioglitazona/indometacina/dexametasona)

Debido a la poca eficacia de las terapias anteriormente descritas y la progresión acelerada de la enfermedad; se consideró la administración de una terapia innovadora patentada por el Grupo de Investigación de Patologías músculo esqueléticas (E038, IDIS) (patente número EP19382094), en la cual se incluye el uso de pioglitazona/indometacina/dexametasona. Los efectos adversos de la triterapia fueron evaluados para la administración en la Paciente1, los cuales no representaron un riesgo mayor a la progresión de la enfermedad por lo que se administró 3 días antes de una cirugía programada para la exéresis de una de las placas de osificación.

La medicación fue bien tolerada a excepción de epigastralgia que mejoró con tratamiento con omeprazol. Sin embargo, el uso de corticoides (dexametasona) se cree que pudo contribuir a una mala cicatrización de las heridas en el lecho quirúrgico, así como sobreinfección bacteriana asociada; y, por otro lado, la progresión de la enfermedad fue evidente, con aparición de nuevas placas óseas fundamentalmente en área cercana al lecho quirúrgico abdominal y en miembro inferior derecho a nivel inguinal.

4.1.6 Procedimientos quirúrgicos

La Paciente1 se ha sometido a diversos procedimientos quirúrgicos con fines paliativos, antiálgicos y mejorar, en la medida de lo posible, su calidad de vida.

A continuación, se describen en orden cronológico las intervenciones quirúrgicas realizadas en la Paciente1 durante la progresión de la enfermedad (*Tabla 10*)

Tabla 10. Procedimientos quirúrgicos realizados en la Paciente1 posterior a la progresión acelerada

Año	Procedimiento
2015	Cirugía por osteomielitis del 5º dedo de pie izquierdo, fusión entre 4º y 5º dedo
2016	Exéresis de osificación en región abdominal izquierda Exéresis de osificación en glúteo derecho y epifisiodesis de fémur distal derecho
2017	Exéresis de osificación perineal preservando piel suprayacente, y de otra placa más profunda en glúteo derecho Hemiepifisiodesis anterior de rodilla izquierda Hemiepifisiodesis anterior tibia proximal derecha
2018	Exéresis de 3 placas de osificación: 2 localizadas en línea media por encima del pubis, una de tipo superficial y la otra en fascia. Y otra en zona axilar posterior izquierda Exéresis de osificación en región escapular y supra iliaca. Además, se obtienen y remiten diversas muestras para estudio incluyendo calcificaciones heterotópicas subcutáneas de ambas localizaciones, tejido adiposo y piel normal
2019	Exéresis de placas suprapúbica que afecta fascia de músculos rectos y se continua en profundidad. Tras la exéresis, se sustituye fascia por malla de matriz natural de colágeno (EGIS) dejando Exéresis de placa abdominal lateral superficial y uso de dermis artificial (Integra) para relleno dérmico evitando adherencias fascia-piel
2020	Exéresis de placa transmural a nivel infraumbilical de aproximadamente 8cm de ancho y 5cm de profundidad, resección de un segmento de 6x4cm de fascia de rectos, resección de placa de osificación superficial en región inguinal izquierda sobre placa recidivada dejando subyacente una gran placa lisa que afecta a toda la musculatura de la pared lateral del abdomen uniéndose con el iliaco ipsilateral; y exéresis de espícula ósea de una placa de la pierna izquierda Exéresis de placa lateral derecha (infiltrando musculo transverso del abdomen) y quiste de contenido líquido de región glútea
2021	Colostomía en colon descendente de tipo Hartmann Amputación transfemoral (1/3 proximal) del miembro inferior izquierdo

4.2 CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DEL EPIGENOMA DE LAS PACIENTES CON HOP

4.2.1 Comparación del perfil de metilación entre pacientes HOP y controles

El perfil de metilación diferencial entre las pacientes con HOP y tres controles (pareados por sexo y edad) se realizó mediante el estudio de asociación del epigenoma completo (EWAS, por sus siglas en inglés) con la tecnología de *microarray Infinium MethylationEPIC BeadChip* de Illumina.

Se realizó el control de calidad y filtrado inicial de los datos crudos que consisten en más de 850.000 sitios CpG que se incluyen en el *microarray*. Se conservaron 833.480 posiciones que fueron utilizados en los análisis *downstream* (búsqueda de posiciones y regiones diferencialmente metiladas y análisis de *pathways*).

De acuerdo con el análisis de deconvolución para la estimación de la composición celular entre las muestras de las pacientes con HOP y los controles, no se encontraron diferencias significativas en los diferentes tipos celulares en la sangre. El análisis de metilación corregido por edad se realizó mediante un modelo de regresión lineal del cual se obtuvieron 2.491 posiciones (CpGs) diferencialmente metiladas con un P-valor ajustado $<0,01$ en las pacientes con HOP con respecto a los controles; 56,2% de estas posiciones se encuentran hipometiladas (1.401 CpGs) y el resto (1.090 CpGs) hipermetiladas. Del total de posiciones, el 29,7% se clasificaron como islas (CGI; 741); 5,1% como CpGs *shelf* (126); 22% *shore* (549); y 43,1% como *OpenSea* (1.075). En cuanto al sitio en que se encuentran estas posiciones con respecto a la estructura de los genes, cerca del 40% se encuentran localizadas en regiones intergénica; y del resto, el 48% está en el cuerpo; el 19,5% está en sitios de inicio de transcripción (TSS, por sus siglas en inglés); 15,3% en las regiones TSS200 y TSS1500 (región de 200 y entre 200-1500 nucleótidos *upstream* del TSS, respectivamente); 14% están en regiones UTR's (región no traducida, por sus siglas en inglés) de las cuales el 10% están en 5'UTR y el 4% en 3'UTR.

Se seleccionaron los CpGs con diferencia de metilación del 20% (delta beta $>0,2$) entre pacientes HOP y controles. De esta forma, identificamos 579 posiciones (**Figura 33**) asociadas a 308 genes, de los cuales 182 posiciones estaban hipermetiladas y 397 hipometiladas en pacientes con HOP (**Figura 34**).

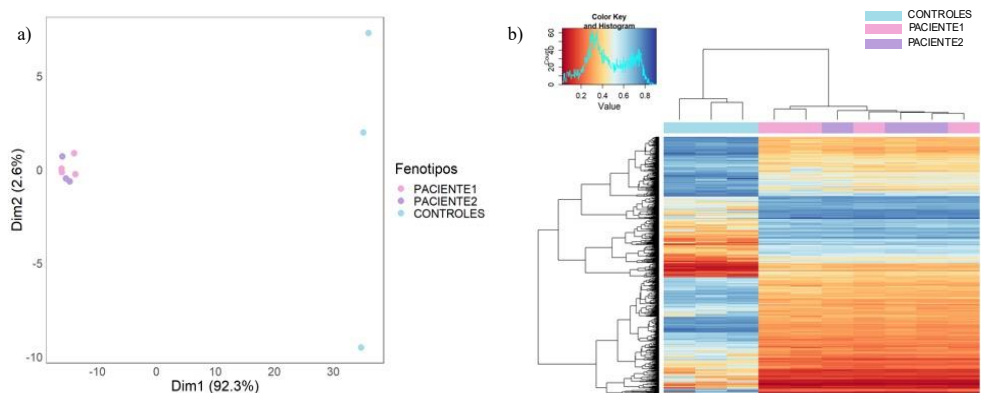


Figura 33. Representación de CpGs diferenciales entre pacientes HOP y controles
a) PCA que muestra la separación de los fenotipos (pacientes HOP y controles), b) *Heatmap* de las posiciones con mayor diferencia (P-valor $<0,01$) de metilación entre las pacientes con HOP y el grupo control

Identificamos aquellas DMP, con el P-valor más bajo, valor beta más alto, que estuvieran en el *locus* de algún gen o en sus regiones promotoras asociadas (5'UTR, TSS200 y TSS1500) y las agrupamos dependiendo del gen en el que se encuentran. Los principales hallazgos fueron tres posiciones *shore* en TSS200/TSS1500 del gen *RANBP17*, tres *shore* en TSS200 del gen *WRB*, dos *shore* en TS1500 de *ZC2HC1A*; cinco posiciones localizadas en islas en TSS200 en *NFYA/LOC221442*; seis posiciones *shore/OpenSea* en el gen *FAM83A* en el Exon 1 y el cuerpo del gen; cinco posiciones *shore/shelf*/Islas en el cuerpo del gen *DIP2C*; seis posiciones *shore/shelf*/Islas en el cuerpo de genes de la familia HLA; tres en el cuerpo del gen *KCNQ2*; y siete posiciones *OpenSea* en TSS200 del gen *UBE2U* (**Figura 35**).

Los patrones hipermetilados en las pacientes HOP con respecto a los controles se identificaron en los genes *ZC2HC1A* (posiciones cg03983883, cg21140145; **Figura 35a**), *KCNQ2* (cg13023638; **Figura 35b**), genes HLA (cg08845336, cg15708909; **Figura 35c**) y *FAM83A* (cg26140120, cg26820168, cg27053337; **Figura 35d**). Los genes con patrones hipometilados son *NFYA*, *RANBP17*, *DIP2C*, *DUSP14*, *UBE2U*, *WRB* (**Figura 36**).

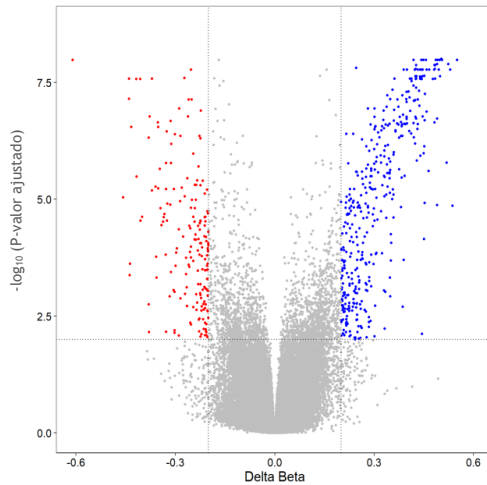


Figura 34. Volcano plot del estado de metilación entre las pacientes con HOP vs controles. Los puntos rojos representan CpGs significativamente hipometilados y los puntos azules los CpGs significativamente hipermetilados

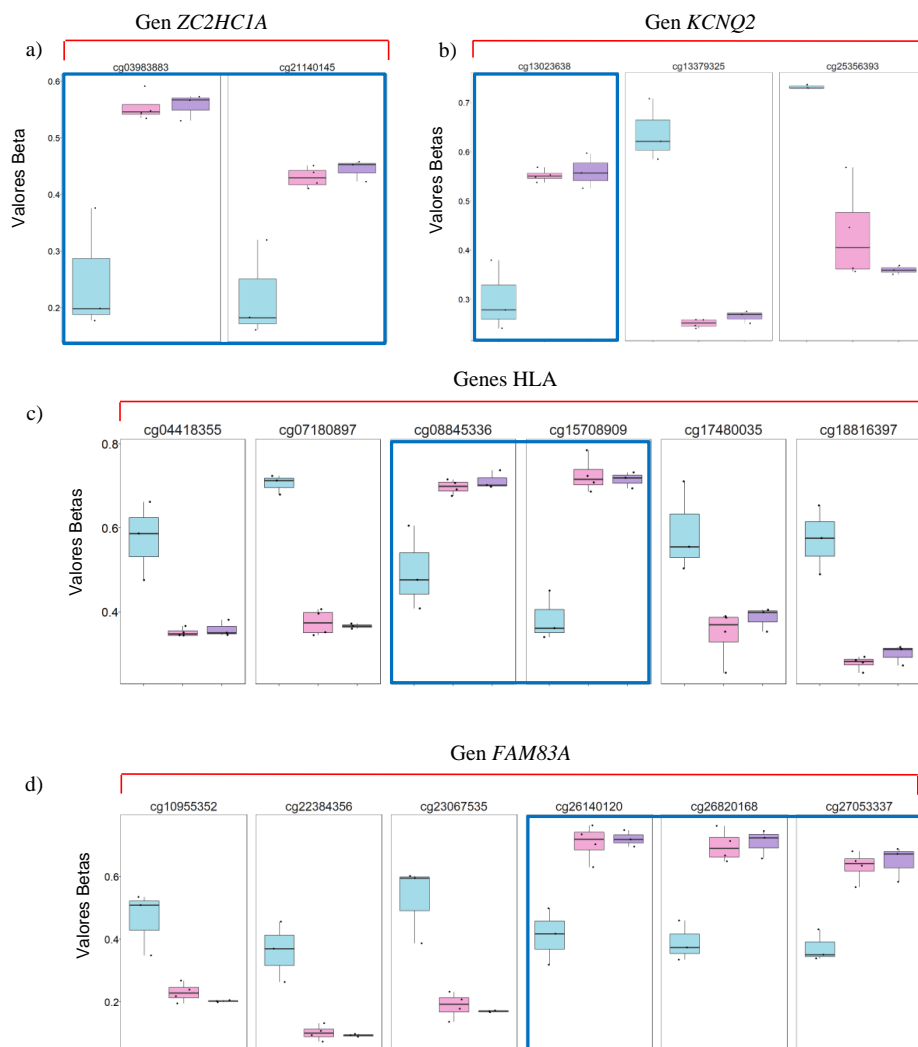


Figura 35. Representación de las posiciones hipermetiladas en un mismo gen en las pacientes HOP (recuadro azul) respecto a los controles

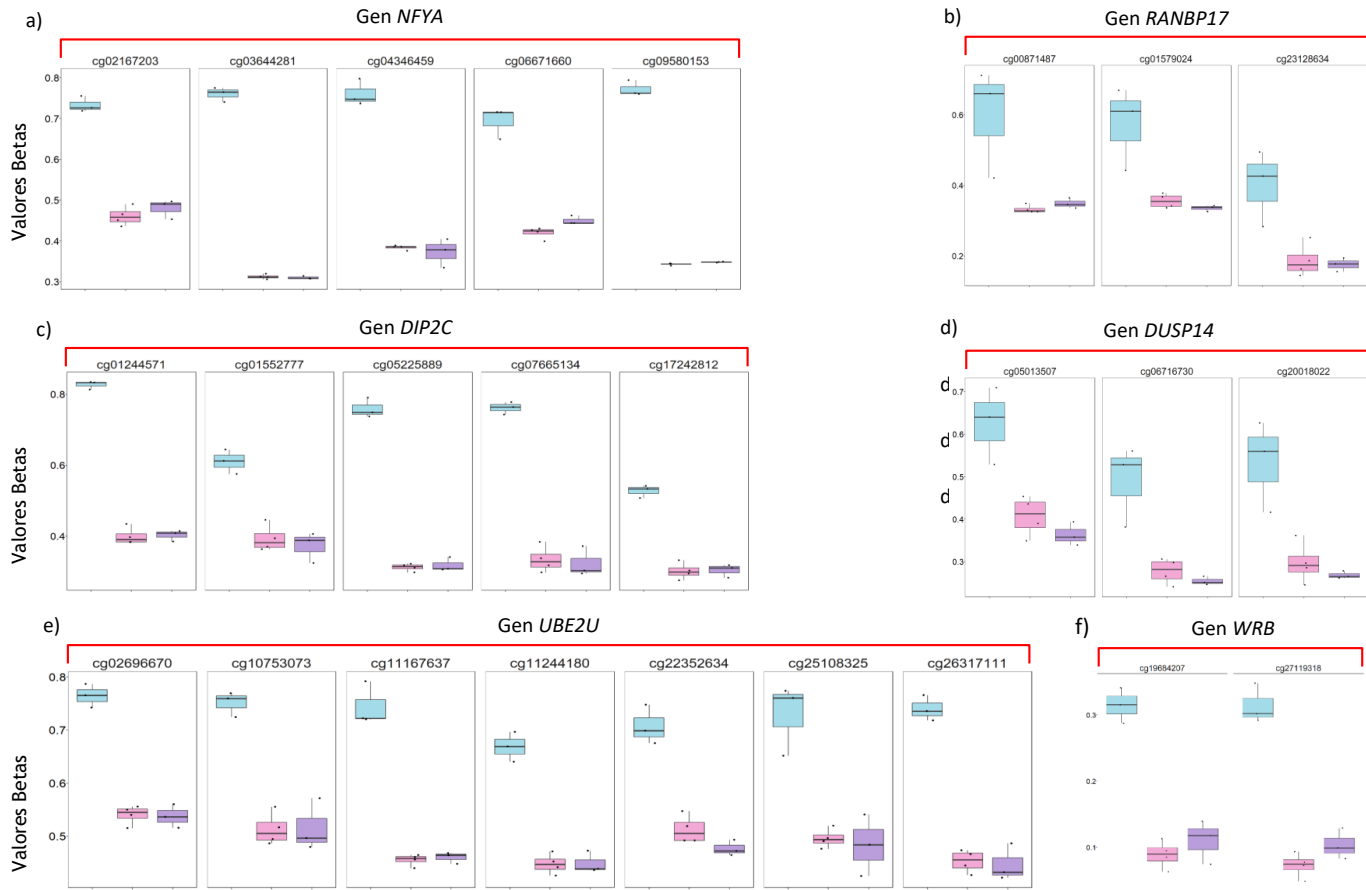


Figura 36. Representación de las posiciones hipometiladas en un mismo gen en las pacientes HOP con respecto a los controles

4.2.2.1 Análisis de enriquecimiento en términos de ontología génica (GO) de la comparación del perfil de metilación entre las pacientes HOP y controles

El análisis de enriquecimiento en términos GO de todas las DMP identificadas en la comparación de pacientes HOP y el grupo de pacientes controles se mostraron sobrerrepresentadas predominantemente en procesos biológicos como el desarrollo del sistema musculoesquelético (GO:0001501) y la respuesta inmunitaria adaptativa (GO:0002460). En cuanto a las funciones moleculares principalmente se encontraron relacionadas con la actividad transportadora pasiva transmembranal (GO:0022803) y la actividad transportadora pasiva de iones metal (GO:0046873). Los componentes celulares vimos una sobrerrepresentación en su mayor parte en la membrana del endosoma (GO:0010008) y la matriz extracelular con colágeno (GO:0062023) (*Figura 37*).

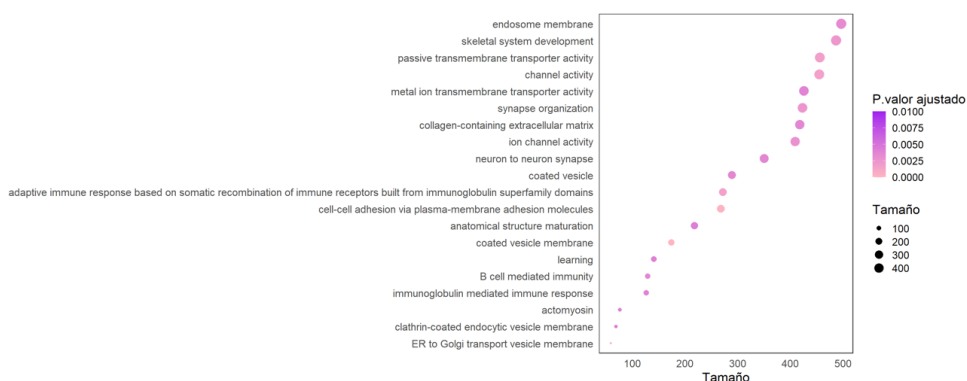


Figura 37. Sobre-representación en términos GO de las posiciones diferencialmente metiladas entre las pacientes con HOP y los controles

Se presentan las categorizaciones GO significativas (P-valor <0,05) de las posiciones diferencialmente metiladas en todo el genoma comparando a las pacientes con HOP y los controles

Seleccionamos el grupo de DMP que se encuentran localizadas exclusivamente en regiones promotoras y las analizamos realizando el enriquecimiento en términos GO. Hubo una sobrerrepresentación en los procesos biológicos de la generación de metabolitos precursores y de energía (GO:0006091), la regulación del transporte intracelular (GO:0032386), entre otros. Las funciones moleculares principales que se identificaron fue la actividad reguladora del trifosfato de nucleósido (GO:006059), la actividad GTPasa (GO:0003924) y la función del activador de la transcripción de unión al ADN (GO:0001216) (*Figura 38*).

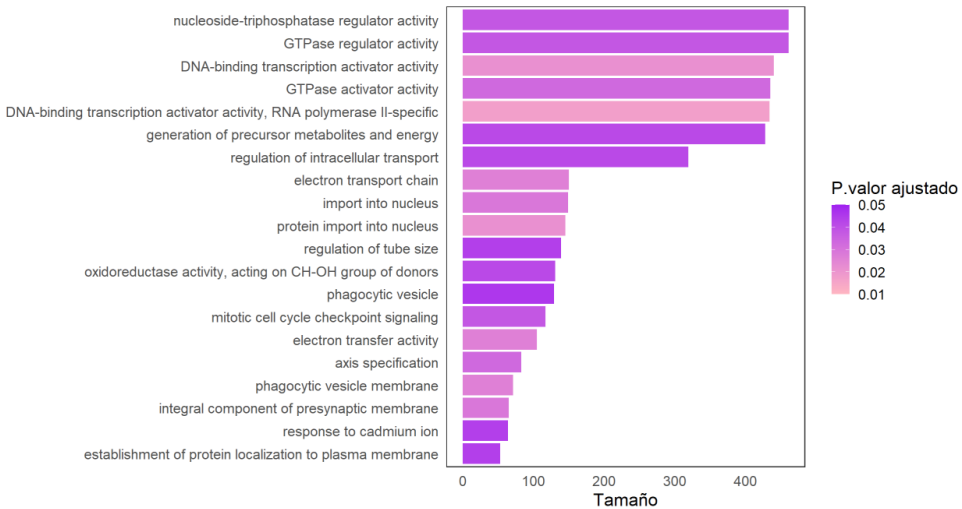


Figura 38. Sobre-representación de CpGs diferencialmente metiladas en zonas promotoras, entre las pacientes con HOP y controles
Se presentan las categorizaciones GO significativas (P-valor <0,05)

4.2.2 Comparación del perfil de metilación entre pacientes HOP

Se analizaron los perfiles de metilación entre las pacientes con HOP con el fin de identificar diferencias que permitan explicar la disparidad fenotípica de la enfermedad entre ellas.

En una primera aproximación se utilizó un modelo de regresión lineal corregido por la edad. Se encontraron 19.689 DMP con un P-valor <0,05 y 1.832 posiciones con P-valor <0,01; de estas últimas, 1.148 posiciones (62,7%) estaban hipometiladas y 684 (37,3%) hipermetiladas en la Paciente1 con respecto a la Paciente2. La proporción alta de posiciones hipometiladas en la Paciente1 se mantiene constante en las Islas, en las regiones *shore*, *shelf* y en las *OpenSea*. En cuanto a su localización en los genes, la hipometilación está presente en el cuerpo del gen, en las regiones UTR y en los sitios de inicio de transcripción (TSS155, TSS200).

El análisis de las posiciones con mayor diferencia en los patrones de metilación identificó 58 DMP entre las pacientes con HOP (**Figura 39; ANEXO 6**), de las cuales 43 se encuentran hipermetiladas en la Paciente1 (**Figura 40**). De las 58 CpGs, la mayoría se clasifica como Islas y se encuentra tanto en el cuerpo del gen, como en regiones promotoras. Estas posiciones están localizadas en los cromosomas 1, 2, 10, 15 y 16 principalmente (**Figura 41**).

La posición con mayor diferencia en hipometilación en la Paciente1 se encuentra en el gen *CHTF8* (factor de fidelidad de transmisión cromosómica 18), mientras que la CpG con mayor diferencia en hipermetilación está en una isla en el cuerpo del gen *MGRNI* (Mahogunin).

El análisis de enriquecimientos en términos GO de las DMP metiladas entre la Paciente1 y Paciente2 en todo el genoma, se observaron sobrerrepresentadas mayoritariamente en procesos biológicos como rutas de señalización del receptor acoplado a la proteína G (GO:0007186) y procesos metabólicos celulares de lípidos (GO:0044255); en funciones moleculares de actividad del receptor de señalización transmembranal (GO:0004888) y actividad transferasa (GO:0016746) (**Figura 42**).

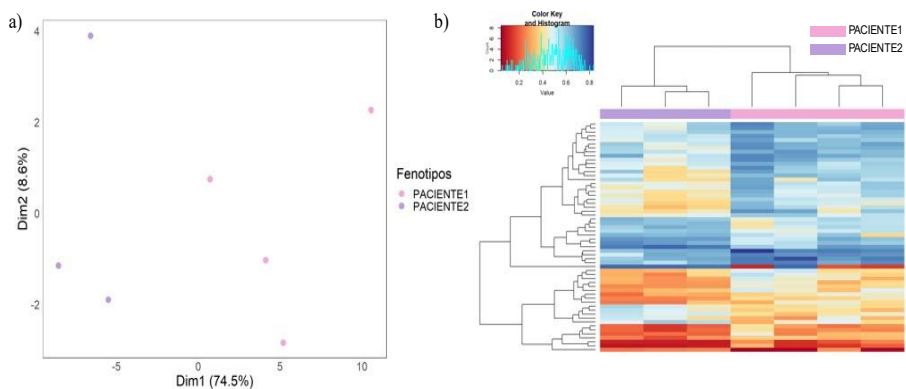


Figura 39. Representación de CpGs diferencialmente metiladas entre pacientes HOP
 a) PCA que muestra la separación de la Paciente1 y la Paciente2, b) *Heatmap* de las posiciones con mayor diferencia de metilación entre las pacientes con HOP (P-valor <0,01)

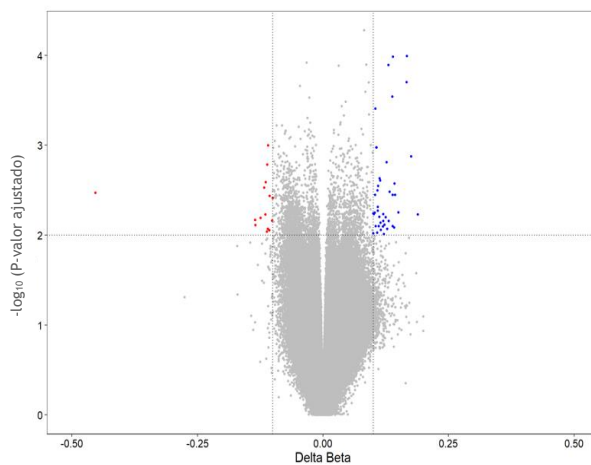


Figura 40. *Volcano plot* del estado de metilación entre las pacientes con HOP
 Las posiciones con un P-valor ajustado <0,01 y cumpliendo: delta B >0,1 o delta B <-0,1 se representa en color azul y rojo respectivamente

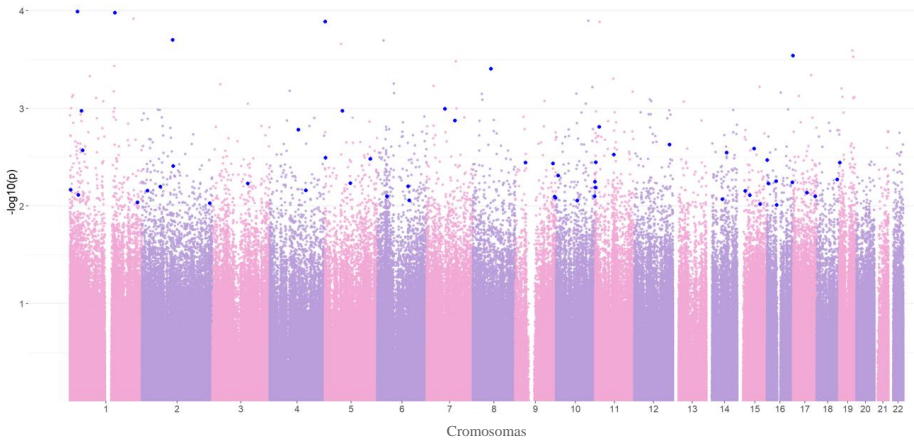


Figura 41. Manhattan plot con la representación de las posiciones diferencialmente metiladas entre la Paciente1 comparada con la Paciente 2
 Los puntos azules representan los patrones diferencialmente metilados (DMP) con un $\Delta B > 0,10$

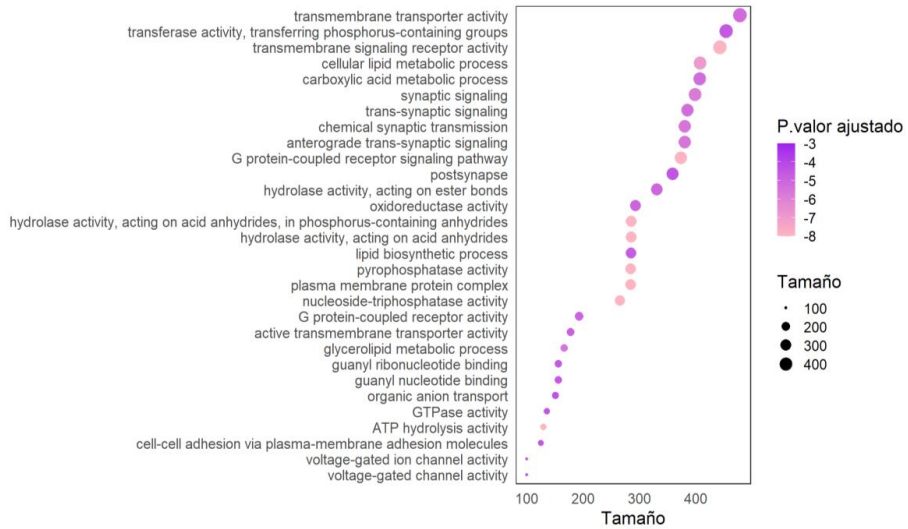


Figura 42. Sobrerrepresentación de CpGs diferencialmente metiladas en todas las posiciones del genoma en la Paciente1 con respecto a la Paciente2
 Se presentan las categorizaciones GO significativas (P-valor <0,05)

El análisis del perfil de metilación en el gen *GNAS* entre las pacientes con HOP frente a controles, no determinó ninguna posición significativa con *P*-valor corregido por FDR. Sin embargo, considerando un umbral de significancia de *P*-valor sin ajustar $<0,05$, fue posible identificar dos posiciones localizadas en la misma región del gen y clasificadas como Islas. La comparación entre las pacientes con HOP y los controles reveló un patrón de metilación muy parecido entre los controles y la Paciente2, comparado con la Paciente1. La **Figura 43** muestra el grado de metilación de las posiciones con un patrón distinto, en donde encontramos que la cg03264550 está hipometilada en la Paciente1, en comparación con controles sanos (*P*-valor = 0,002) y Paciente2 (*P*-valor = 0,03); mientras que, la posición cg10748817 está hipermetilada en la Paciente1, que en los controles (*P*-valor = 0,005) y su hermana gemela (*P*-valor = 0,008). La localización de las posiciones resulta en la codificación de diferentes productos de transcripción asociados al gen (**ANEXO 7**).

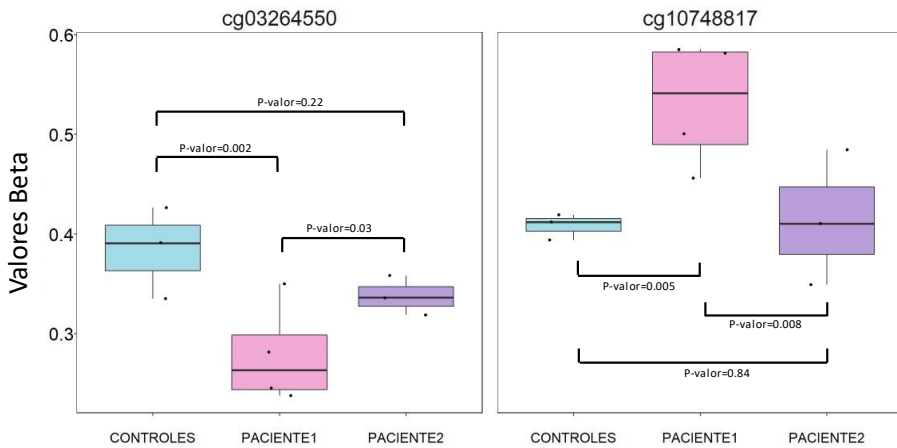


Figura 43. Representación de las posiciones diferencialmente metiladas en la Paciente1, la Paciente2 y Controles en el gen *GNAS*

4.3 CAPÍTULO 3. PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DIFERENCIAL ENTRE TEJIDOS DE PACIENTE CON HOP Y TEJIDOS CONTROL; Y DE SANGRE PERIFÉRICA ENTRE LA PACIENTE1 Y LA PACIENTE2

4.3.1 Comparación de patrones de expresión génica de muestras de osificación de la Paciente1 con tejido óseo normal de paciente control sano

Se estudiaron los patrones de expresión diferencial en 2 muestras de osificación de la Paciente1 (obtenidas de la zona abdominal y escapular) y de hueso obtenido de tibia de un individuo sano, para así poder detectar genes o procesos biológicos con expresión alterada involucrados en el metabolismo óseo del tejido sano.

Las osificaciones, abdominal y escapular, mostraron valores similares de expresión génica y estas a su vez presentaron un patrón diferencial de expresión con respecto al control (**Figura 44a**). Existe una alta correlación entre los valores Log_2FC de ambas osificaciones ($r^2 = 0,82$, p -valor = $2,2 \times 10^{-16}$) utilizando el hueso de control como referencia (**Figura 44b**; **ANEXO 8**), apuntando a ese comportamiento similar de ambas osificaciones.

Cuando comparamos los niveles de expresión entre el tejido control y las osificaciones en la zona abdominal (OH_{abd}) y escapular (OH_{esc}) encontramos varios genes sobre-expresados ($\text{Log}_2\text{FC} > 4$). Entre los que se encuentran: i) el gen *COMP* ($\text{Log}_2\text{FC} = 6,6$ y $6,4$, en OH_{abd} y OH_{esc} , respectivamente) que codifica para la proteína oligomérica de la matriz del cartílago; ii) *MMP7* ($\text{Log}_2\text{FC} = 5,6$ y 5 en OH_{abd} y OH_{esc} , respectivamente), que produce la proteína de matriz metalopeptidasa 7 involucrada en la degradación de algunos componentes de la matriz extracelular y iii) *PPARGCIA* ($\text{Log}_2\text{FC} = 5,3$ y $4,4$, en OH_{abd} y OH_{esc} , respectivamente), que codifica el coactivador del receptor *gamma* 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas, implicado en la regulación de la energía celular y en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos. También identificamos genes altamente infra-expresados ($\text{Log}_2\text{FC} < 4$) como el gen *BMP5* ($\text{Log}_2\text{FC} = -4,74$ y $-5,82$, en OH_{abd} y OH_{esc} , respectivamente), que codifica para la proteína morfogénica 5, relacionada al desarrollo de tejido óseo y cartílago; y el gen *EYAI* ($\text{Log}_2\text{FC} = -4,03$ y $-5,11$, en OH_{abd} y OH_{esc} , respectivamente), coactivador transcripcional de fosfatasa 1, que participa en procesos de reparación del DNA.

Cabe destacar que, a pesar de esta similitud entre los patrones de expresión de ambas osificaciones, encontramos genes que mostraron una expresión diferencial entre las osificaciones OH_{abd} y OH_{esc} , que fueron *FOS*, *MMP9*, *PLA2G2A*, *SFRP2*, *SOCS3* y *THBS4*, de los cuales *PLA2G2A*, *SFRP2* y *THBS4* mostraron un comportamiento aditivo de menor expresión en el tejido control y mayor expresión en la OH_{abd} e incluso aun mayor en la OH_{esc} . Sin embargo, los genes *MMP9* y *SOCS3* mostraron una tendencia opuesta en los valores de Log_2FC en ambas muestras problema con respecto al control. (**Figura 44c**).

Debido a la similitud existente entre las osificaciones (OH_{abd} y OH_{esc}), las comparaciones de ambas frente al hueso control identificaron los mismos genes con expresión génica alterada ($\text{Log}_2\text{FC} > |1,5|$); por lo que el análisis de enriquecimiento posterior fue llevado a cabo empleando dichos genes comunes y separándolos en dos grupos, los genes sobre-expresados y los genes infra-expresados frente al control sano. La ruta que mostró una diferencia más significativa en el grupo de genes sobre-expresados fue la ruta del *TGF- β* (P -valor ajustado = $1,88 \times 10^{-07}$), el cual incluye a una familia de citoquinas involucradas en la homeostasis del tejido conectivo y sistema esquelético, además de considerarse crítico en el proceso de osteogénesis (**Figura 45**; **ANEXO 9**). Se identificó además una desregulación significativa de otras rutas relacionadas con el metabolismo óseo como es: i) la ruta Wnt, con sobre-expresión en los genes *DKK2*, *EGFR*, *FZD7*, *SFRP1*, *SFRP2* y *SOX9* (P -valor ajustado = $0,0005$) e infra-expresión de los genes *Notch*, *HHEX*, *LEF1* y *FZD8* (P -valor ajustado = $0,001$); y ii) la ruta de las proteínas morfogénicas óseas (*BMP*) sobre-regulada por los niveles de expresión de los genes *COMP*,

SFRP2, *SFRP1*, *SOX9*, *TGFB3* (P-valor ajustado = 0,0005) e infra-regulada por los genes *NOTCH1*, *BMP8A*, *LEF1* y *BMP5* (P-valor ajustado = 0,002).

En el contexto de la regulación de procesos del desarrollo óseo, biomineralización formación de osificación y diferenciación osteogénica, se observaron diferencias entre los tejidos afectados de la Paciente1 con respecto al control. Observando sobreexpresión de los genes *COMP* y *SOX9* involucrados en el desarrollo y diferenciación condrogénica, así como en el proceso de osificación endocondral. Se observó un desequilibrio en la expresión génica involucrada en procesos de proliferación de células epiteliales, identificando sobreexpresión en los genes *CDKN2B*, *EGFR*, *FZD7*, *IGF1*, *SFN*, *SFRP1*, *SFRP2*, *SOX9* con un p-valor ajustado = $3,6 \times 10^{-05}$, e infra-expresión en los genes *BMP5*, *DLL4*, *FLT1*, *NOTCH1*, *PGF*, *TLR4* y *VEGFC*, P-valor ajustado = $1,5 \times 10^{-04}$.

Otros procesos en los que se observó una sobre-regulación de genes en las muestras de las placas OH_{ab/esc} fueron aquellos relacionados con el destino o *commitment* de las MSCs a precursores osteoblásticos y adipocíticos, ambos implicados en trastornos de remodelación ósea [189] (sobre-expresión de los genes *FZD7*, *SFRP2* y *SOX9*; P-valor ajustado = 0,003); y en procesos implicados en la regulación del ciclo celular, y más específicamente en la transición de la fase G1/S (p-valor ajustado = 0,002) (**Figura 45**).

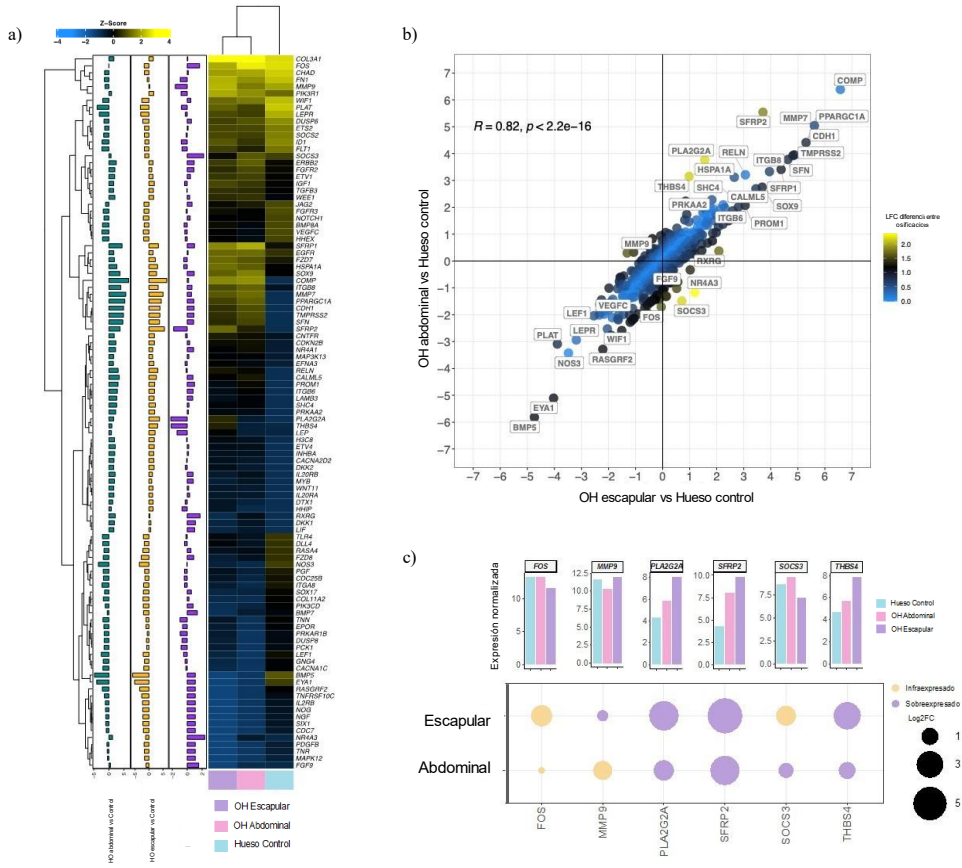


Figura 44. Análisis de expresión génica diferencial de osificación de Paciente1 y hueso control
 a) Heatmap y perfil de expresión génica de osificación escapular y abdominal de la Paciente1 y de hueso control. Se representan los genes con un $\text{Log}_2\text{FC} > |1,5|$ entre las muestras.
 b) Correlación de los valores Log_2FC obtenidos de las comparaciones independientes entre las osificaciones y el hueso control. Los genes anotados corresponden a los genes con un valor $\text{Log}_2\text{FC} > |2|$ obtenidos de cualquiera de las comparaciones.
 c) Se representan los genes con mayor expresión diferencial entre la osificación escapular y la abdominal ($\text{Log}_2\text{FC} > |1,5|$). La expresión normalizada de los genes se representa en los gráficos de barras, mientras que los valores de Log_2FC entre las muestras de la Paciente1 y el control se muestra en el gráfico de burbujas.

4.3.2 Patrones de expresión génica en la piel de la Paciente1 comparado con la piel del paciente control

Se realizó el análisis comparativo de expresión génica en piel obtenida de dos zonas diferentes de la Paciente1 (rodilla y glúteo) y piel de un control sano. Tras el análisis exploratorio inicial identificamos un patrón de expresión diferencial entre las muestras de la Paciente1 con respecto a la piel del paciente control (**Figura 46a**), observamos una pobre correlación entre los valores Log_2FC de comparaciones independientes entre las muestras de piel de la Paciente1 y el control ($r = 0,28$; **Figura 46b**).

Las diferencias de expresión más destacadas ($\text{Log}_2\text{FC} > |1,5|$), se observaron en la piel obtenida de la rodilla, la cual se localizaba adherida a la osificación, con un total de 57 genes sobre-expresados y 22 infra-expresados con respecto al control. Por el contrario, la piel obtenida de la zona del glúteo mostró solo dos genes sobre-expresados y diez infra-expresados, con un perfil de expresión muy similar al de la piel control (**ANEXO 10**).

Los genes con niveles más altos de expresión en la piel de la rodilla fueron: i) factor de transcripción *ZBTB16* ($\text{Log}_2\text{FC} = 4,53$); ii) *SFRP4* ($\text{Log}_2\text{FC} = 4,44$); iii) *FGF2* ($\text{Log}_2\text{FC} = 4,4$); iv) *DDIT4* ($\text{Log}_2\text{FC} = 4,44$); v) *PIK3R1* ($\text{Log}_2\text{FC} = 4,44$) y vi) *LIFR* ($\text{Log}_2\text{FC} = 4,44$). Los genes que mostraron niveles mayores de infra-expresión en la muestra de la piel de rodilla fueron los genes *SFN* ($\text{Log}_2\text{FC} = -4,21$) y *IL20RB* ($\text{Log}_2\text{FC} = -3$). Comparativamente, la piel obtenida del glúteo no mostró niveles tan diferentes de expresión con respecto al control, siendo los que mostraron cambios más significativos los genes *COL2A1* ($\text{Log}_2\text{FC} = 2,43$) y *PRKAR2B* ($\text{Log}_2\text{FC} = 2,02$) ambos sobre-expresados y los genes *COMP* ($\text{Log}_2\text{FC} = -3,10$) y *FOS* ($\text{Log}_2\text{FC} = -2,78$) infra-expresados.

Los genes con diferencias de expresión más significativas entre las dos muestras de piel de la Paciente1 mostraron niveles de sobre-expresión en la piel de la rodilla e infra-expresión en la piel del glúteo con respecto a la piel control. Esas diferencias estaban representadas por los genes *IBSP*, *MMP9*, *COL1A1*, *COL3A1* y *COL1A2*, todos involucrados en la organización de la matriz extracelular y en el desarrollo tanto del tejido epidérmico como del tejido óseo (**Figura 46c**).

Por otro lado, los genes que mostraron cambios de expresión significativos con respecto al control con un comportamiento similar en ambas muestras de la Paciente1 fueron el gen de la proteína de choque térmico (*HSPB1*, $\text{Log}_2\text{FC} = -1,51$ en rodilla y $-1,5$ en glúteo; infra-expresada) implicada en la diferenciación de diferentes tipos celulares; el gen de una proteína quinasa dependiente de AMPc (*PRKAR2B*, $\text{Log}_2\text{FC} = 2,0$ en rodilla y $\text{Log}_2\text{FC} = 3,8$ en glúteo, sobre-expresada) involucrada en la homeostasis del tejido adiposo; y del factor de transcripción *ZBTB16* ($\text{Log}_2\text{FC} = 4,5$ en rodilla y $\text{Log}_2\text{FC} = 1,5$ en glúteo; sobre-expresada) implicado en la progresión del ciclo celular y desarrollo de tejidos diferenciados (**ANEXO 10**). Todos estos genes juegan un papel principal o secundario en alguno de los procesos implicados en el metabolismo óseo.

El análisis de enriquecimiento en términos GO de los genes con mayor cambio de expresión ($\text{Log}_2\text{FC} > |1,5|$) en la piel de la rodilla comparada con la piel control, mostró una sobrerregulación significativa en los procesos relacionados con la respuesta a factores de crecimiento; la ruta de señalización *MAPK*, *BMP*, *Wnt*, *PI3K*; en la proliferación, diferenciación y migración de células epiteliales; diferenciación de condrocitos y osificación endocondral; así como en el desarrollo del sistema esquelético. Asimismo, se encontraron rutas infra-reguladas de forma significativa, siendo las más detectables las rutas relacionadas con el *commitment* celular, morfogénesis del epitelio embrionario y la diferenciación de células de la grasa parda (genes *JAG2*, *Wnt16*, *Wnt3*, *Wnt4*, *BMP7*, *PRDM1*, *CEBPA* y *PIMI1*; **ANEXO 11**). Sin embargo, en la piel del glúteo se observaron infra-regulados significativamente los procesos relacionados

con el desarrollo del sistema esquelético; la diferenciación de osteoblastos; la osificación; la diferenciación de condrocitos y osificación endocondral; y los procesos relacionados con remodelación ósea y mineralización (genes *COL1A1*, *COMP*, *IBSP*, *MMP9*, *COL1A2*, *COL3A1*; **Figura 45**; **ANEXO 12**).

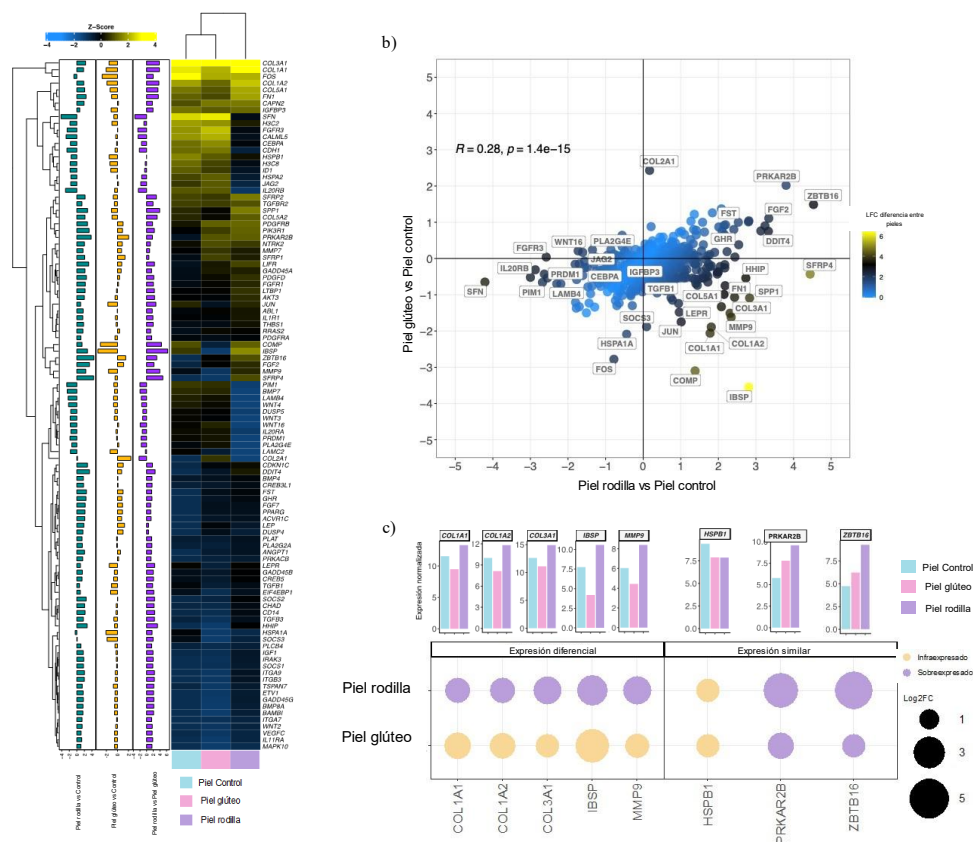


Figura 46. Análisis de expresión diferencial entre piel de Paciente1 y piel control

a) *Heatmap* y análisis de patrones de expresión génica en piel de rodilla y glúteo, así como de piel control. Se representan los genes con un valor $\text{Log}_2\text{FC} > 1.5$ entre las muestras.

b) Gráfico de la correlación de los valores Log_2FC obtenidos de las comparaciones independientes entre piel de rodilla, piel de glúteo de la Paciente1 y piel control. Se incluyen los genes con valores de $|\text{Log}_2\text{FC}| > 2$ en cualquiera de las comparaciones.

c) Se representan los genes con mayor diferencia en el patrón de expresión ($\text{Log}_2\text{FC} > |1.5|$) entre la piel de la rodilla y el glúteo. La expresión normalizada de los genes se representa en los gráficos de barras, mientras que los valores de Log_2FC entre las muestras de la Paciente1 y el control se muestra en el gráfico de burbujas.

4.3.3 Perfil de miARN en muestra de sangre de las pacientes con HOP

Se realizó la comparación de los perfiles de expresión de miARN en la sangre de la Paciente1 frente a la Paciente2, en donde identificamos 12 miARN con una expresión significativamente diferente ($\text{Log}_2\text{FC} > |1,5|$ y que superaron los umbrales de expresión definidos; ver apartado 3.5.6), diez de ellos sobre-regulados (Log_2FC entre 1,51 y 2,58) y dos infra-regulados ($\text{Log}_2\text{FC} = -1,57$ y $-1,55$) (**Figura 47a**).

A la hora de investigar el impacto biológico de estos cambios en los perfiles de miARNs detectados, llevamos a cabo una predicción de los posibles genes dianas de estos 12 miARN, interrogando 5 bases de datos diferentes y considerando solamente los genes que aparecieron como dianas en al menos tres bases de datos. Se detectaron un total de 2,844 genes dianas siendo los miARNs con mayor número de dianas: i) hsa-miR-497-5p (n=730); ii) hsa-miR-106b-5p (n=656); iii) hsa-miR-454-3p (n=468); iv) hsa-miR-548a-3p (n=329) y v) hsa-miR-338-5p (n=300). Por el contrario, el miARN con menor número de dianas asociado fue hsa-miR-518f-3p con solo 6 genes diana.

Los miARNs y los genes dianas que mostraron un mayor peso en el grado de interacción (aquellos que tuvieran un valor de *ranking* agregado < 30) se sometieron al análisis de sobrerrepresentación en términos de GO. Se incluyeron un total de 824 genes dianas. El análisis de enriquecimiento mostró la asociación de solo 6 miARNs con las categorías GO, cinco de ellos sobre-regulados y uno infra-regulado (hs-miR-454-3p).

Los términos GO con mayor significancia se asociaron con la sobreexpresión del hsa-miR-338-5p y la infra-expresión del hsa-miR-454-3p, además se detectaron otros procesos comunes entre ambos miARNs, cada uno de ellos con diferentes genes diana implicados. Se trata de la ruta de señalización *TGF-beta* (GO:0071559, GO:0071560, GO:0007179) y *commitment* y diferenciación celular (GO:0045165, GO:0045446). Por otro lado, el hsa-miR-338-5p y hsa-miR-518f-3p se asociaron a vías de diferenciación de células adiposas (GO:0045598, GO:0090335, GO:0090336). Los términos relacionados con la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (GO:0040037), osificación (GO:0001503) y la diferenciación de osteoblastos (GO:0001649) se asociaron significativamente con los genes diana del hsa-miR-338-5p.

Otros términos relevantes que se encontraron fueron los relacionados con la migración y motilidad celular (GO:0030336 y GO:2000146, hsa-miR-454-3p); la modificación de las histonas y de la cromatina (GO:1905269 y G=:0031058, hsa-miR-454-3p); y la apoptosis (GO:0008625, hsa-miR-548a-3p).

4.3.4 Estudio comparativo exploratorio de transcriptoma completo mediante RNAseq de muestras de sangre de la Paciente1 y la Paciente2

Realizamos el análisis de expresión diferencial de muestras de sangre periférica empleando las réplicas simuladas a partir de la Paciente1 (identificamos como HOP-grave) y la Paciente2 (identificadas como HOP-asintomático), en donde obtuvimos 969 genes con una probabilidad de $>0,95$ de estar diferencialmente expresados entre ambos fenotipos (los más representativos descritos en el *ANEXO 13*). De estos 969 genes, 537 mostraron sobre-expresión en la paciente con HOP-asintomático mientras que 432 mostraron sobre-expresión en la paciente con HOP-grave (*Figura 48*). En cuanto al biotipo (*ANEXO 14*) de los genes diferencialmente expresados 675 fueron genes que codifican proteínas y 157 resultaron ser lnc-RNAs (ARNs largo no codificante, por sus siglas en inglés; *Tabla 11*).

Tabla 11. Genes con alta probabilidad $>0,95$ de estar diferencialmente expresados entre HOP grave y HOP asintomática

Biotipo	n	%
codificantes de proteínas	675	69,66%
lnc-RNA	157	16,20%
pseudogen procesado	80	8,26%
transcrito de pseudogen sin procesar	14	1,44%
IG V gen	10	1,03%
pseudogen sin procesar	8	0,83%
snoRNA	4	0,41%
TR V gen	4	0,41%
Transcrito de pseudogen procesado	3	0,31%
Pseudogen polimórfico	2	0,21%
IG C gen	2	0,21%
Transcrito de pseudogen unitario	2	0,21%
IG C pseudogen	2	0,21%
mt-rRNA	1	0,10%
Pseudogen unitario	1	0,10%
misc RNA	1	0,10%
scaRNA	1	0,10%
IG V pseudogen	1	0,10%
TEC	1	0,10%

Centrando la atención en los genes más importantes que diferencian un fenotipo del otro (probabilidad $>0,99$) y a los que presentaron mayores valores de *ranking*, observamos una sobre-expresión en HOP-asintomático (o infra-expresión en HOP-grave) de varios genes que codifican proteínas ribosomales (*RPS27*, *RPL39*, *RPL7* y *RPL17*), genes que codifican componentes de la citocromo C oxidasa involucrada en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria (*NDUFA4* y *COX7C*), genes relacionados con la transcripción (*ZNF22* y *POLR2K*) y genes de respuesta inmune frente a infecciones (*LY96* y diferentes genes inducidos por interferón como *IFI44L*, *IFI44*, *IFI27* o *IFIT1*).

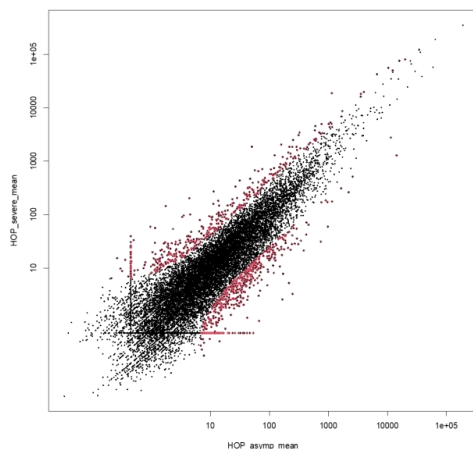


Figura 48. *Expression plot* de HOP grave y HOP asintomático. Valores de la media de los niveles de expresión obtenidos de las comparaciones entre las réplicas simuladas a partir de la muestra de sangre periférica de la Paciente1 (HOP severe) y la Paciente2 (HOP asymp). Los genes marcados en rosa corresponden a los genes con probabilidad de $>0,95$ de estar diferencialmente expresados entre las pacientes.

Algunos de los genes diferencialmente expresados más salientables que mostraron sobre-expresión en HOP-grave se encontraron localizados en el cromosoma 20 (al igual que el gen *GNAS*, **Figura 49**), más concretamente los genes *PI3*, *MMP9*, *TUBB1* y *MYL9*.

Distribución de DEG a través de los cromosomas

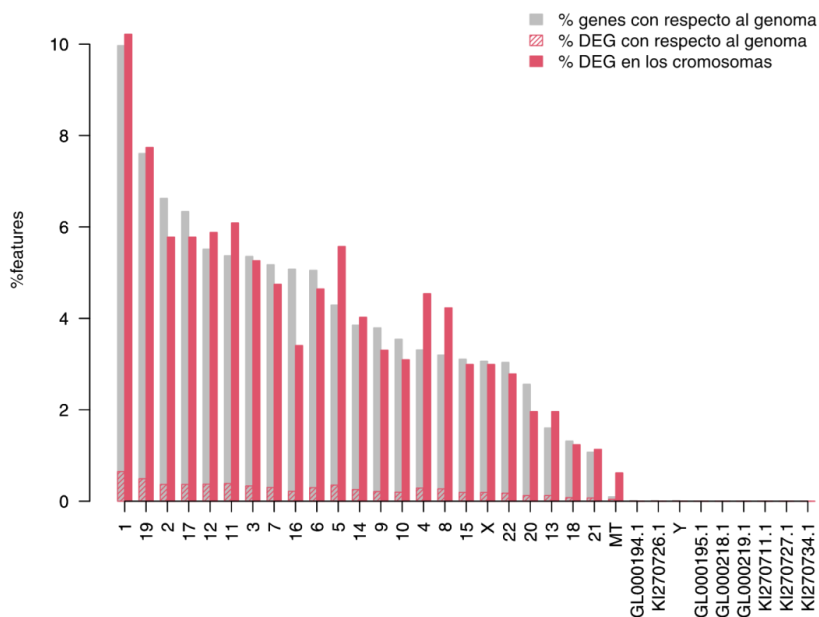


Figura 49. Distribución por cromosomas de genes con probabilidad alta ($> 0,95$) de estar diferencialmente expresados entre HOP grave y HOP asintomático

También encontramos sobre-expresados genes relacionados con la activación/adhesión de plaquetas, como fueron el *PF4*, *GP9*, *TREML1* y *MYL9* y genes implicados en la regulación del ciclo celular, como *SPDYC* (Speedy/RINGO Cell Cycle Regulator Family Member C).

Analizando en profundidad los procesos biológicos en los que aparecieron implicados los genes diferencialmente expresados (probabilidad >0,95) nos encontramos sobre-representación de varias categorías GO, entre las que podemos destacar los procesos de respuesta inmune, inflamación y coagulación (**Figura 50**). Entre los términos sentados podemos encontrar algunos procesos relacionados con vías de señalización célula-célula, diferenciación y migración celular o rutas inter-relacionadas que desempeñan funciones reguladoras fundamentales en el desarrollo del cartílago y la formación ósea, como la vía Wnt o MAPK (**Figura 51**).

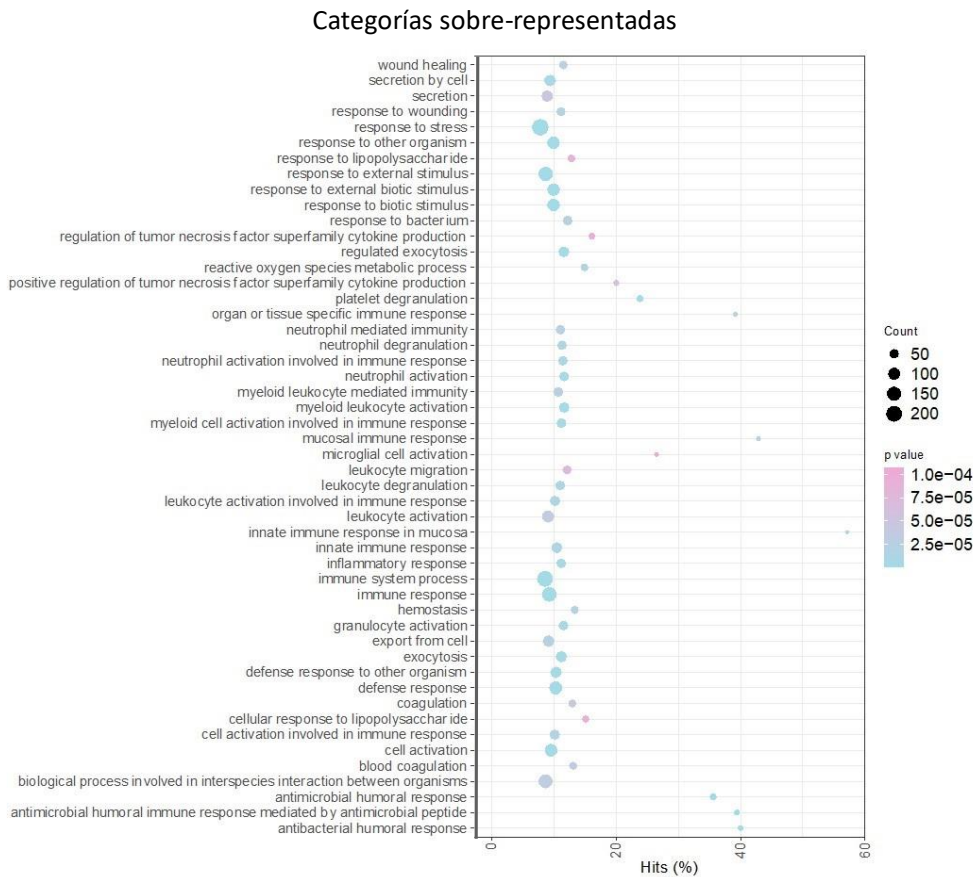


Figura 50. Sobre-representación en términos GO de los genes con alta probabilidad (>0,95) de estar diferencialmente expresados entre HOP grave y HOP asintomática

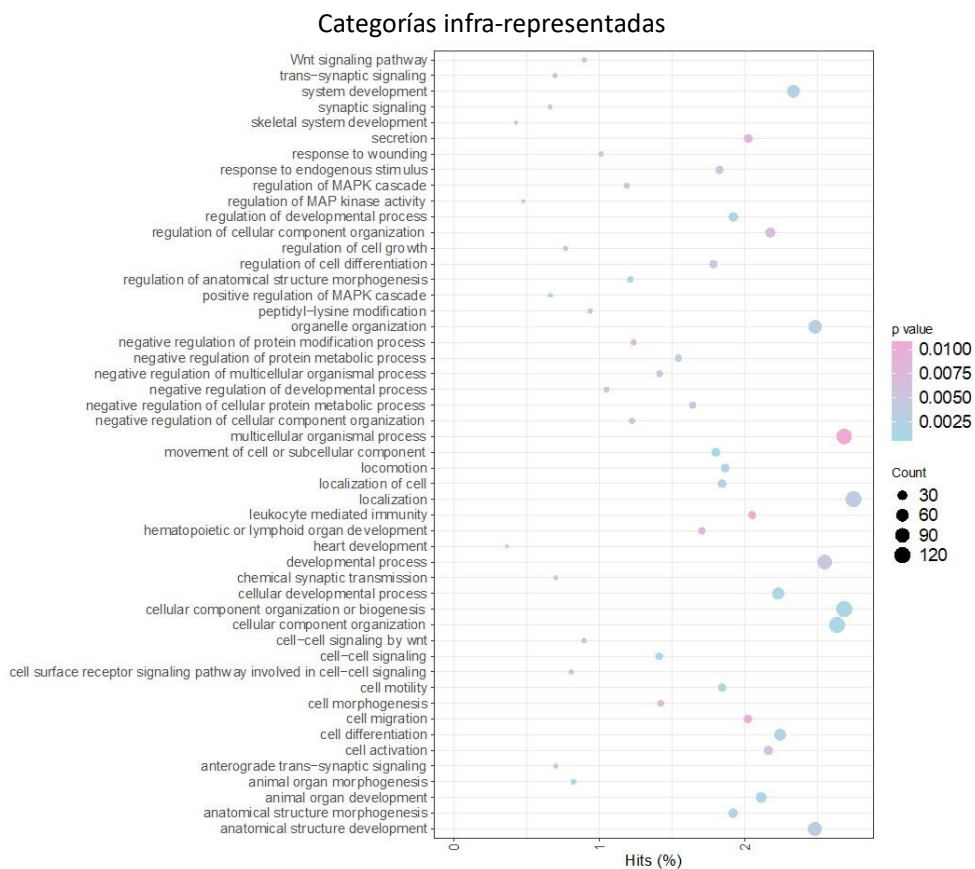


Figura 51. Infra-representación en términos GO de los genes con alta probabilidad (>0,95) de estar diferencialmente expresados entre HOP grave y HOP asintomática

4.4 CAPÍTULO 4. ANÁLISIS PROTEÓMICOS EN SUEROS DE LAS PACIENTES CON HOP

Los análisis proteómicos con tecnología LC-MS/MS permite la identificación de todas las proteínas contenidas en muestras complejas como son el suero y el plasma sanguíneo. En este capítulo se describen los resultados obtenidos a partir de los análisis proteómicos realizados con tecnología Triple TOF en el suero de las pacientes con HOP (Paciente1 y Paciente2) y el suero de pacientes sin HOP.

4.4.1 Análisis cualitativo

Para el análisis proteómico analizamos a la Paciente1, a la Paciente2 y a las pacientes juntas, consideradas como grupo HOP; además, se incluyeron seis pacientes sin HOP como grupo control.

Se identificaron un total de 263 proteínas en el *pool* de muestras analizadas, las cuales fueron utilizadas como librerías para realizar las distintas comparaciones.

Sesenta y cuatro proteínas fueron identificadas exclusivas del grupo HOP; 47 proteínas exclusivas el grupo control; y, 152 proteínas compartidas entre ambos grupos (*Figura 52a*).

Analizando el grupo HOP por separado, se identificaron 34 proteínas exclusivas de la Paciente1, 22 exclusivas de la Paciente2 y 47 exclusivas del grupo control. Además, encontramos un grupo de 13 proteínas en común entre la Paciente2 y los controles que no comparten con la Paciente1; 8 proteínas que comparten la Paciente1 y Paciente2, pero no se encuentran en los controles. y 12 proteínas compartidas entre la Paciente1 y controles que no se identificaron en la Paciente2 (*Figura 52b, ANEXO 15*).

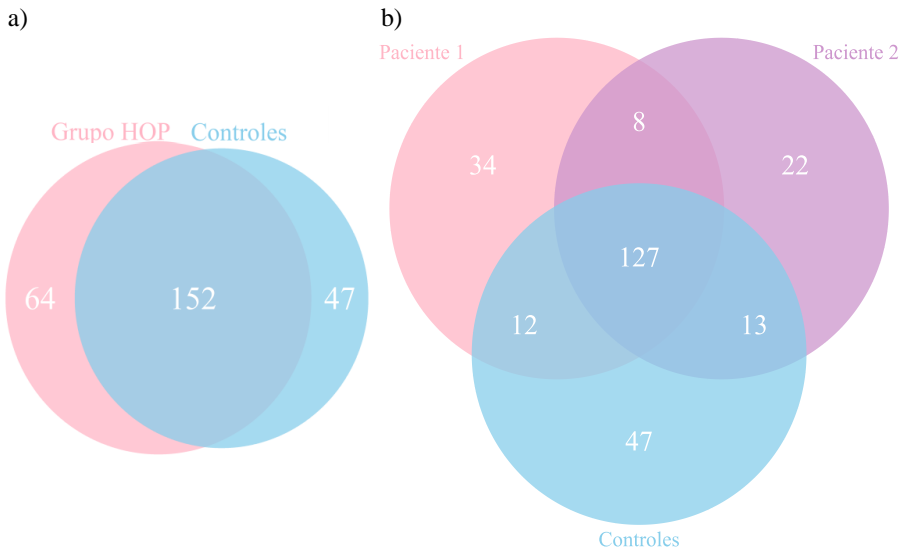


Figura 52. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en el análisis proteómico cualitativo
a) Comparación entre grupo HOP vs. Controles.
b) Comparación entre Paciente1, Paciente2 y Controles

Dentro de las proteínas únicas en la Paciente1 se identificaron componentes de unión al calcio y un regulador positivo de la vía de señalización Wnt, implicada en la diferenciación de osteoblastos [354]. En las proteínas exclusivas de la Paciente2 se identificó, entre otras, la hormona adiponectina, implicada en la diferenciación de células adipocíticas [355]. Dentro de

las proteínas comunes entre ambas pacientes se identificaron proteínas relacionadas con la regulación y activación del sistema inmunológico, con la cascada de la coagulación y con la transportación de los lípidos.

4.4.1.1 Categorización de las proteínas en términos de ontología génica

Las proteínas identificadas en cada grupo fueron categorizadas según los términos GO describiendo los procesos BP, MF y CC en los que participan. Por otra parte, se determinaron las rutas biológicas en los que están involucradas las proteínas de cada grupo, según la base de datos Reactome.

4.4.1.1.1 Análisis GO en grupo HOP

Las proteínas del grupo HOP se sobrerrepresentaron principalmente en procesos biológicos involucrados con: i) la cascada de activación proteica (GO:00723376); ii) la activación del sistema complemento (GO:0006956); iii) la respuesta inmune humoral (GO:0006959); y, iv) la regulación de la respuesta inflamatoria (GO:0002673) (**Figura 53a**).

Como componente celular se identificó que las proteínas están principalmente relacionadas con: i) micropartículas de la sangre (GO:0072562); ii) trimeros de colágeno (GO:0005581); y, iii) proteínas del complejo de ataque a la membrana celular activados por la cascada del complemento (GO:0005579) (**Figura 53b**).

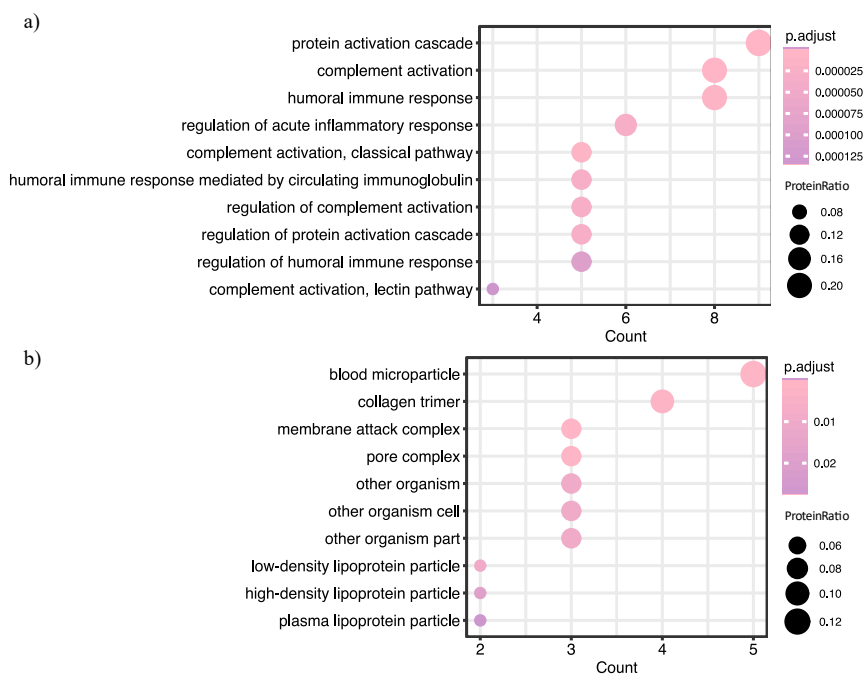


Figura 53. GO sobrerrepresentados en el grupo HOP (P-valor ajustado por BH <0,05)

Se muestran los diez GO con mayor sobrerrepresentación en términos de: a) Procesos biológicos (BP) y b) Componentes celulares (CC). El eje de las x representa el número de proteínas identificadas por MS/MS para cada categoría

Los análisis de sobrerepresentación de las proteínas identificadas en el grupo HOP en rutas biológicas mostraron relación con: i) la hemostasis (R-HSA-109582), mayoritariamente en la adhesión de plaquetas para la exposición del colágeno en la activación y agregación plaquetaria y en interacción de la superficie celular con la pared vascular (**Figura 54**); ii) con la transducción de señales (R-HSA-162582), que se refiere a las señales extracelulares que provocan un cambio en el estado y/o actividad de las células (**Figura 55**); y, iii) con señalizaciones de citoquinas en el sistema inmunológico (R-HSA-1280215; **Figura 56**) [356].

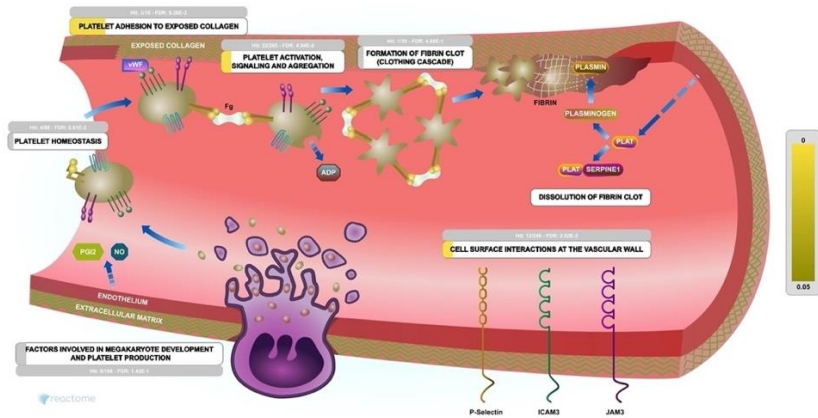


Figura 54. Sobrerepresentación de las proteínas identificadas en el grupo HOP relacionadas con la ruta biológica de la hemostasia (R-HSA-109582). El color en la barra representa un P-valor ajustado por FDR <0,05. Análisis realizado con la herramienta bioinformática REACTOME [356]

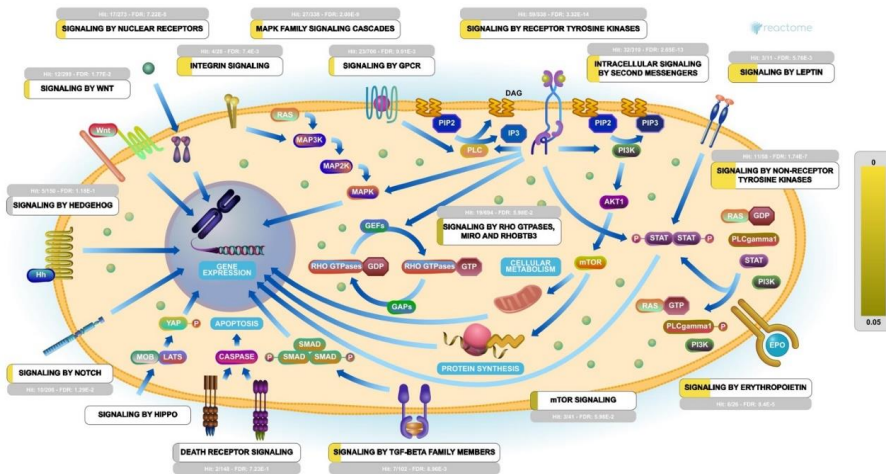


Figura 55. Sobrerepresentación de las proteínas identificadas en el grupo HOP relacionadas con rutas de transducción de señales (R-HSA-162582). El color en la barra representa un P-valor ajustado por FDR <0,05. Análisis realizado con la herramienta bioinformática REACTOME [356]

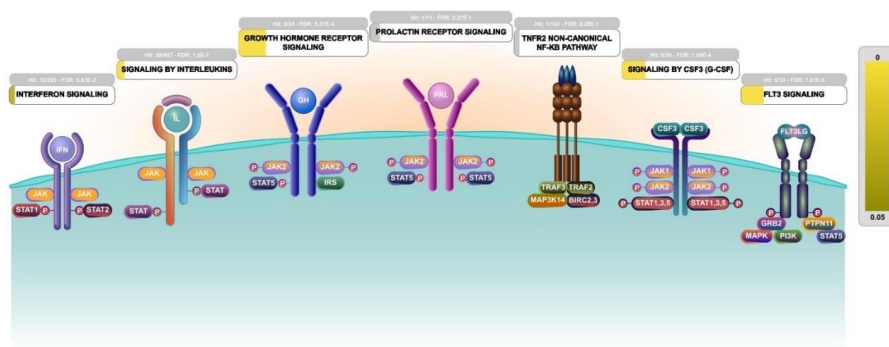


Figura 56. Sobrerrepresentación de rutas de señalización del sistema inmunológico mediante citoquinas (R-HSA-1280215)

Se muestra la participación de proteínas del grupo HOP en señalizaciones de receptores FLT3, CSF3 y hormona de crecimiento. El color en la barra representa un P-valor ajustado por FDR <0,05. Análisis realizado con la herramienta bioinformática REACTOME [356]

4.4.1.1.2 Análisis GO en grupo control

Las 47 proteínas identificadas en el grupo control se sobrerrepresentaron principalmente en procesos de unión a calmodulina (GO:0005516) y a fostadilinositol (GO:1902936); y proteínas que forman parte de las miofibras (GO:0030016) y fibras contráctiles (GO:0043292) (**Figura 57**).

4.4.1.1.3 Análisis GO entre pacientes HOP

Los análisis GO de las proteínas identificadas exclusivamente en la Paciente1 y en la Paciente2 revelaron diferencias relacionadas con la sobrerrepresentación en términos de BP y CC. Se observaron procesos de regulación en el procesamiento, maduración y activación de proteínas, regulación de la respuesta inmune humoral, del sistema complemento y de la respuesta inflamatoria relacionados únicamente con las proteínas identificadas en la Paciente1. Por el contrario, las proteínas exclusivas de la Paciente2 se asociaron a procesos de reconocimiento de células apoptóticas y la activación del complemento por la ruta de la lectina (**Figura 58a**). En términos de componentes celulares, proteínas de la Paciente2 se identificaron

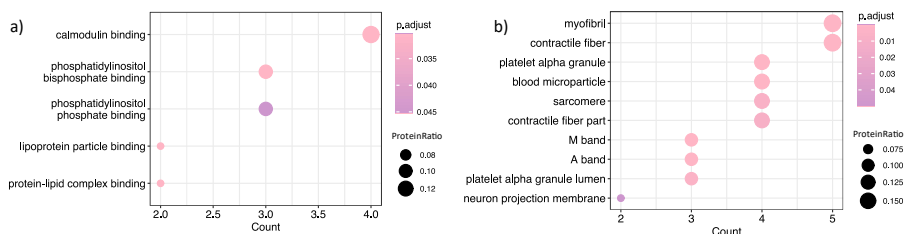


Figura 57. GO sobrerrepresentados en el grupo Control (P-valor ajustado por BH <0,05)

Se muestran los diez GO con mayor sobrerrepresentación en términos de las categorías: a) funciones moleculares, y b) componentes celulares. El eje de las x representa el número de proteínas identificadas por MS/MS para cada categoría.

localizadas principalmente en la membrana externa celular del trímero de colágeno y de micropartículas sanguíneas; en la Paciente1 no se encontraron proteínas para esa anotación (**Figura 58b**). Relacionadas con funciones moleculares se observó una pequeña cantidad de proteínas identificadas en la Paciente1 como parte de la regulación de la cinasa A; mientras que un número mayor de proteínas de la Paciente2 están relacionadas con la unión a antígenos (**Figura 58c**).

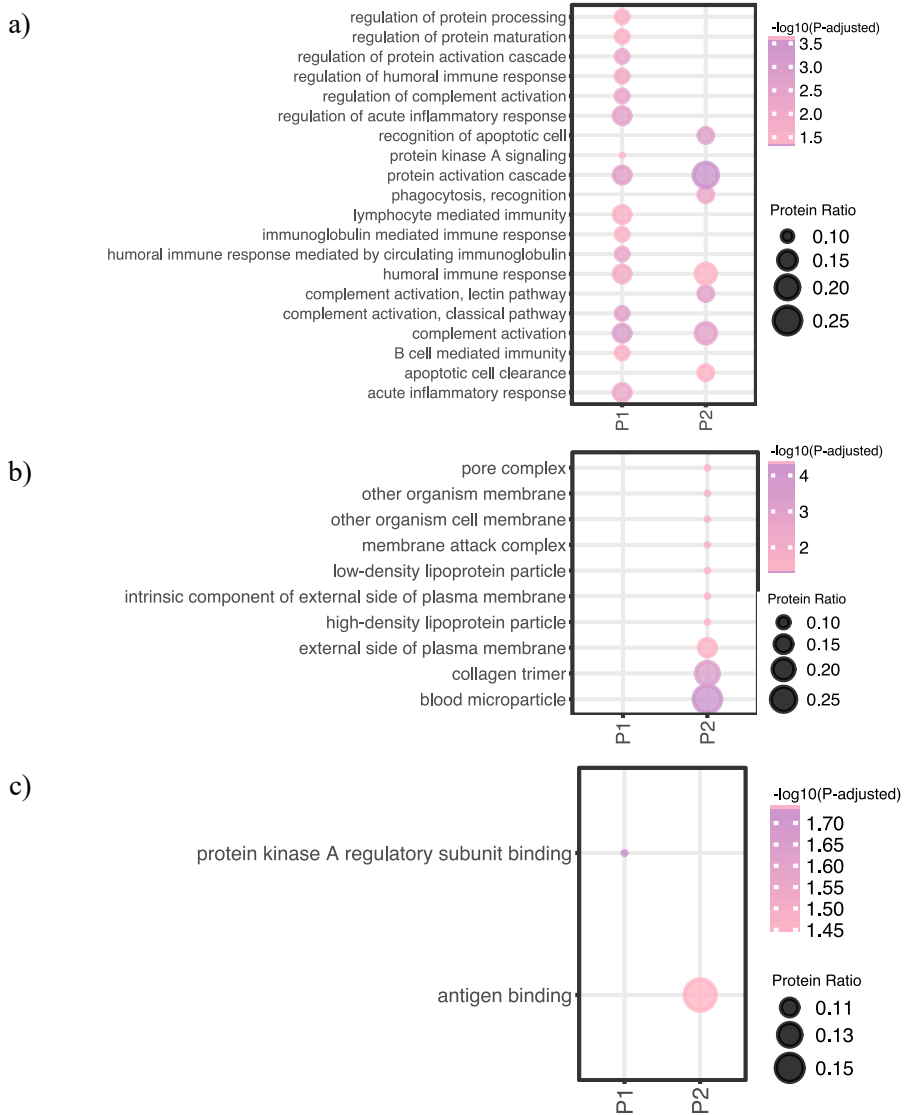


Figura 58. Comparación de los GO de las proteínas identificadas exclusivamente en la Paciente1 (P1) vs. la Paciente2 (P2)

Se muestran los GO con mayor sobrerrepresentados para cada categoría (P-valor ajustado por BH <0,05, representado en $-\log_{10}$): a) BP; b) CC; y c) MF

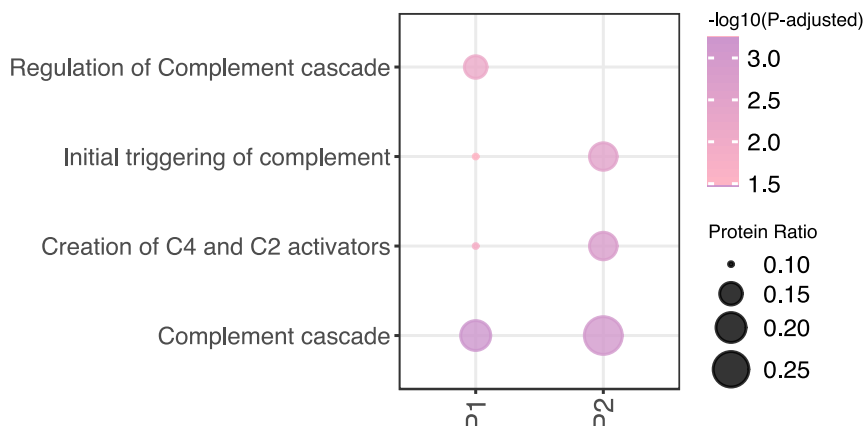


Figura 59. Rutas biológicas asociadas a las proteínas exclusivas identificadas en la Paciente1 (P1) y Paciente2 (P2)

La ratio corresponde al número de proteínas identificadas en cada paciente y el número de proteínas totales identificadas en las rutas biológicas usando la base de datos Reactome (P-valor ajustado por BH $<0,05$, representado en $-\log_{10}$)

Las proteínas exclusivas de ambas pacientes (**Figura 59**) guardan una relación significativa en la ruta biológica del complemento (R-HSA-166658; **Figura 60**), sin embargo, dentro de la misma ruta biológica, proteínas identificadas en la Paciente1 se relacionan con su regulación (R-HSA-977606), mientras que proteínas de la Paciente2 tienen mayor participación como desencadenantes y formadores de activadores del complemento (R-HSA-166663, R-HSA-166786).

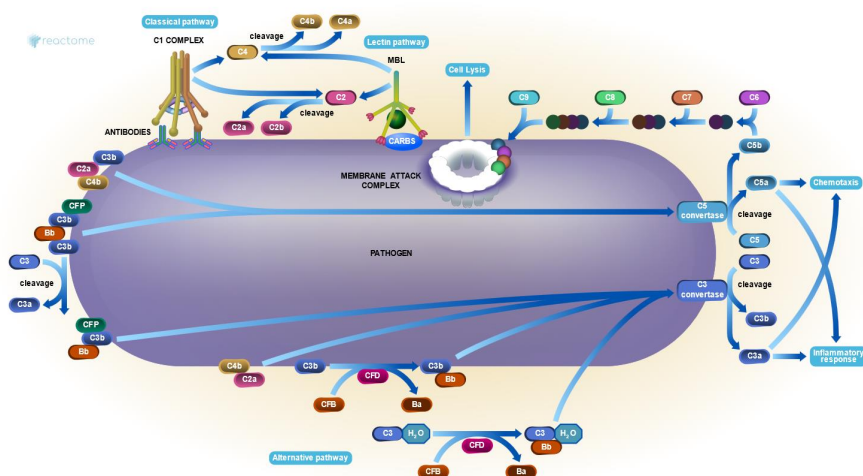


Figura 60. Ilustración de la ruta del sistema complemento (R-HSA-166658)

Relacionada con las proteínas identificadas en las pacientes P1 y P2. Análisis realizado con REACTOME [356]

4.4.1.2 Proteínas presentes en el grupo control y ausentes en grupo HOP

En el análisis proteómico destacó la identificación de dos proteínas que se encuentran de forma exclusiva en alguno de los grupos analizados. En el grupo control se observó la presencia de la proteína *Caveolae-associated protein 3* (codificada por el gen *CAV3*), la cual se localiza en la membrana celular de los fibroblastos, células del músculo liso y adipocitos. Dentro de sus principales funciones de *CAV3* está la interacción y regulación de las subunidades alfa de la proteína G (*Gs-α*), además, es parte de la señalización del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, por sus siglas en inglés) [357–359] (**Figura 61**).

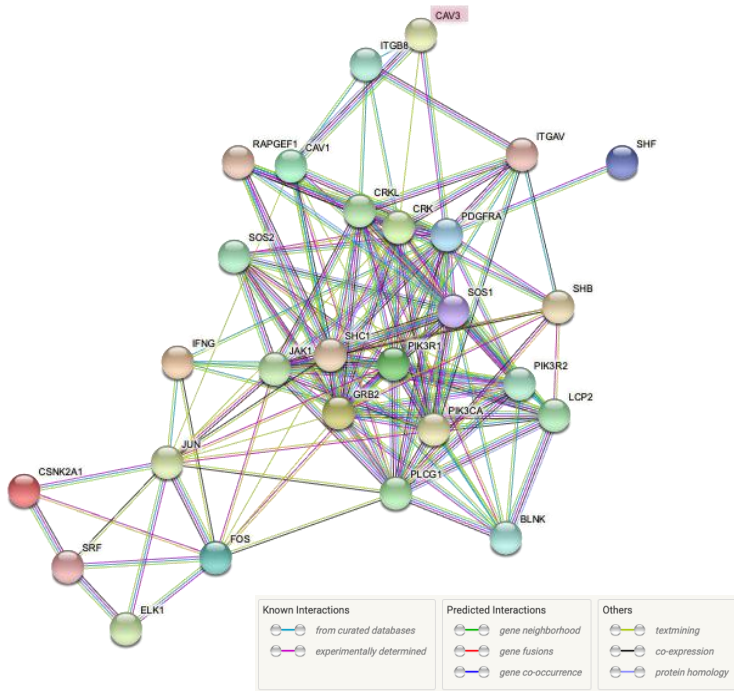


Figura 61. Análisis de interacción proteína-proteína STRING, de la proteína *CAV3* en la ruta de señalización PDGFR (www.string-db.org)

4.4.1.3 Proteínas presentes en el grupo HOP y ausentes en grupo control

En el grupo HOP se identificó exclusivamente la proteína Filamina-C (codificada por el gen *FLNC*), la cual participa en la vía de señalización BMP-SMAD siendo esta una de las rutas de señalización mayormente conservadas en la formación de OH [354] (**Figura 62**).

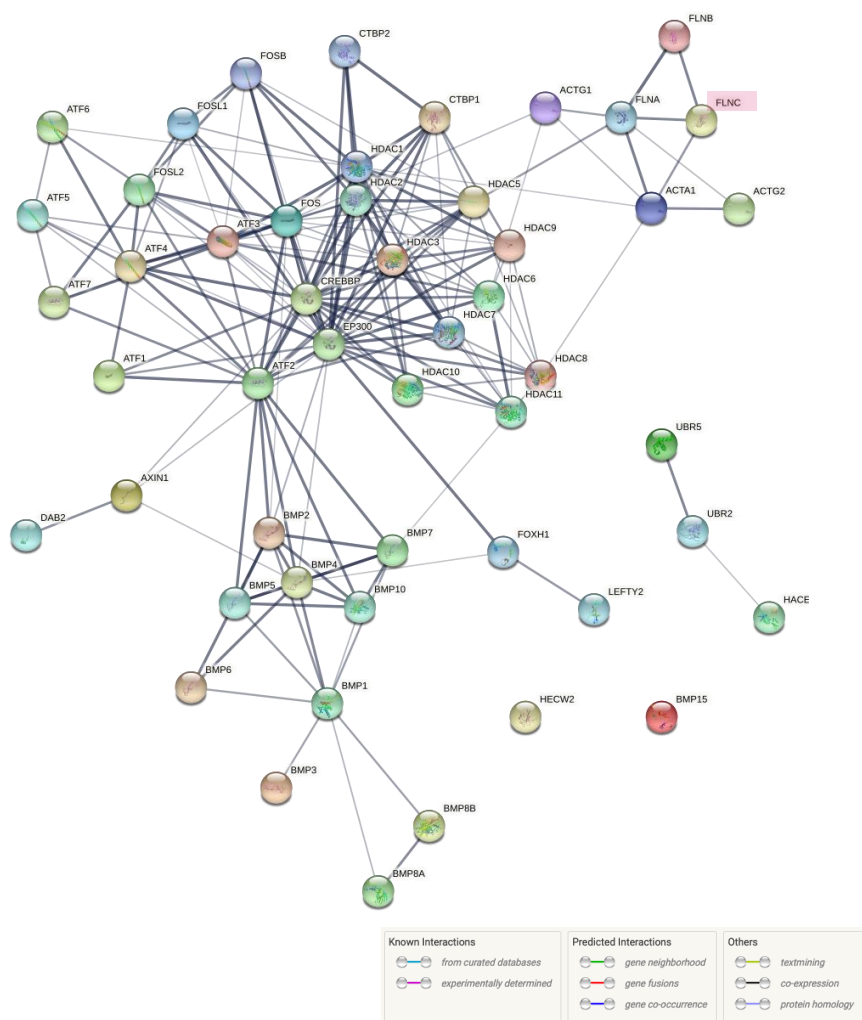


Figura 62. Análisis de interacción de proteína-proteína en la ruta de señalización SMAD
Imagen obtenida de Pathcards (www.pathcard.genecards.org)

4.4.2 Análisis cuantitativo.

El análisis proteómico cuantitativo SWATH/MS de cada grupo de estudio permitió la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas mediante su búsqueda en una librería creada a partir de las proteínas totales identificadas en el *pool* de muestras incluyendo a todos los grupos.

El análisis de sobrerepresentación o enriquecimiento en términos de ontología génica (EGO, por sus siglas en inglés), compara las proteínas diferencialmente expresadas en cada grupo de estudio frente a las proteínas presentes en las anotaciones de la ontología génica (GO), categorizándolas en relación con procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares, además se incluye la sobrerepresentación en función de rutas biológicas (Reactome). Debido a la cohorte de estudio tan limitada en este estudio, los análisis de sobrerepresentación

incluyeron a todas las proteínas diferencialmente expresadas de cada grupo, considerando como único parámetro selectivo el P-valor ajustado <0,05.

4.4.2.1 Identificación de Proteínas Séricas Diferencialmente Expresadas en Pacientes con HOP frente al grupo Control

Se identificaron 100 proteínas diferencialmente expresadas en cada grupo de estudio a partir de la librería conformada por las 124 proteínas totales identificadas en todas las muestras en conjunto.

En el análisis de expresión proteica diferencial entre el grupo HOP y el grupo control, se identificaron un total de seis proteínas diferencialmente expresadas estadísticamente significativas considerando los parámetros de un P-valor ajustado por Bonferroni <0,05 y al menos un $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$ o ≤ -1 . Dentro de las proteínas desreguladas se observaron cuatro proteínas sobre-expresadas y dos infra-expresadas. (**Figura 63**).

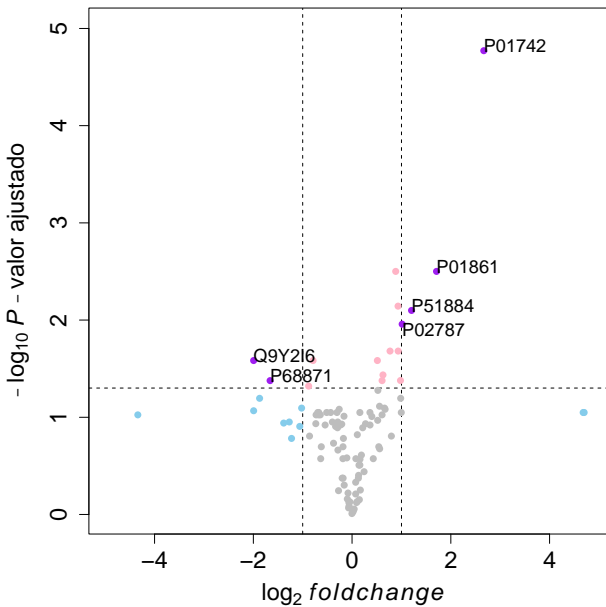


Figura 63. Volcano plot de las proteínas diferencialmente expresadas en el grupo HOP frente al grupo control (P-valor ajustado por Bonferroni <0,05 y un $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$ o ≤ -1)

Se inquirió la funcionalidad relacionada con las proteínas sobre-expresadas en el grupo HOP con la respuesta inmunológica celular y la regulación del complemento (HV169, IGHG4, respectivamente); con el proceso de diferenciación de osteoblastos (LUM) [360]; y, con la estimulación de proliferación celular y transporte de hierro (TRFE). Por otra parte, las proteínas infra-expresadas actúan en transporte de oxígeno (HBB) y en la unión al calcio (NINL) (**Tabla 12**).

Tabla 12. Proteínas diferencialmente expresadas en el grupo HOP vs el grupo Control

Código Uniprot	Código de proteína	Nombre	P-valor ajustado	Log ₂ FC
Proteínas sobre-reguladas en grupo HOP				
P01742	HV169	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 1-69	1,69x10 ⁻⁰⁵	2,6671
P01861	IGHG4	Inmunoglobulina de cadena pesada constante gama 4	3,20x10 ⁻⁰³	1,7103
P51884	LUM	Lumican	8,00x10 ⁻⁰³	1,2036
P02787	TRFE	Serotransferrina	1,10x10 ⁻⁰²	1,0144
Proteínas infra-reguladas en grupo HOP				
P68871	HBB	Hemoglobina subunidad beta	4,19x10 ⁻⁰²	-1,6594
Q9Y2I6	NINL	Proteína similar a Ninein	2,61x10 ⁻⁰²	-1,9942

4.4.2.1.1 Análisis de sobre-representación de proteínas en el grupo HOP frente al grupo Control

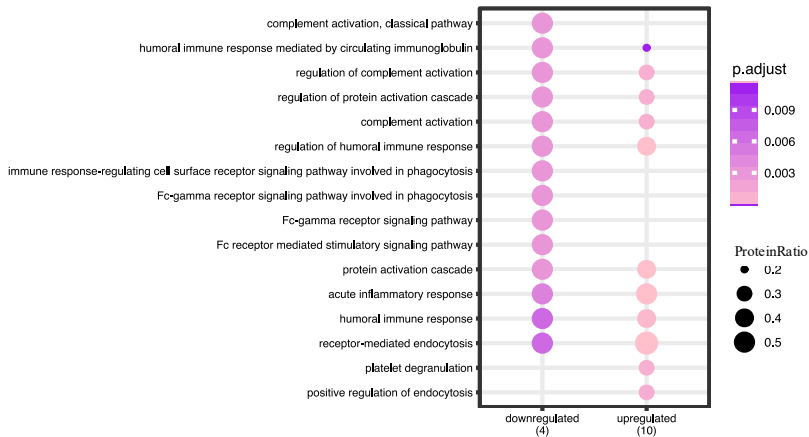
Las proteínas diferencialmente expresadas (n=14) en el grupo HOP se separaron por nivel de expresión en proteínas infra-expresadas (n=4) y proteínas sobre-expresadas (n=10) y fueron funcionalmente categorizadas mediante análisis EGO. Basado en términos de BP las proteínas infra- y sobre-expresadas se relacionaron principalmente con el complemento, con la respuesta inmune humoral y la respuesta a inflamación y procesos de endocitosis. Además, las proteínas sobre-expresadas están relacionadas con procesos de degranulación plaquetaria y regulación de endocitosis (**Figura 64a**)

En términos de MF, las proteínas infra-reguladas mostraron relación con la unión al oxígeno; unión a antígenos; y, con actividad antioxidante y peroxidasa. Mientras que las proteínas sobre-expresadas guardaron relación con la actividad enzimática (**Figura 64b**).

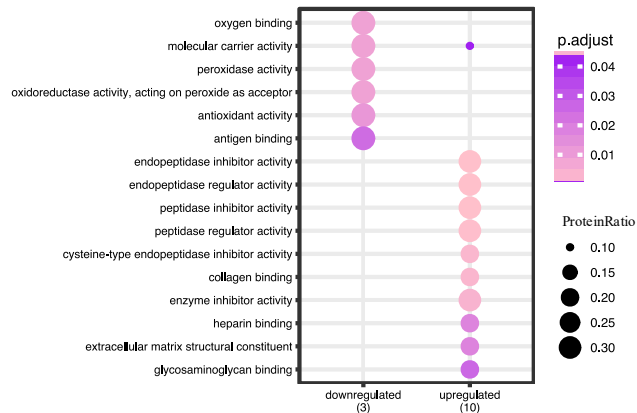
Con base en CC, las proteínas diferencialmente expresadas en el grupo HOP se asociaron a micropartículas sanguíneas principalmente, mientras que particularmente las proteínas sobre-expresadas se relacionaron a la matriz extracelular y al lumen de vesículas (**Figura 64c**).

Las rutas mayoritariamente sobrerrepresentadas son la agregación plaquetaria (R-HSA-76002) que se encontró sobre-expresada en el grupo HOP y de intercambio de gases en los eritrocitos (R-HSA-1480926) infra-expresadas (**Figura 65**).

a)



b)



c)

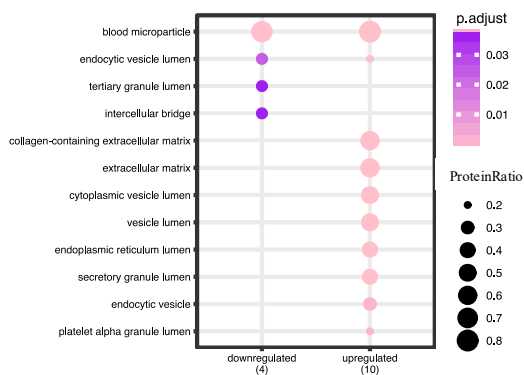


Figura 64. Análisis de enriquecimiento en términos de ontología génica (GO) de proteínas desreguladas en el grupo HOP.

Se muestran las categorías a) BP, b) MF y c) CC. El código de colores representa los niveles de enriquecimiento: el rosa indica alto enriquecimiento y el morado bajo. Los tamaños de los puntos representan la ratio entre las proteínas identificadas en el grupo de estudio entre las proteínas totales de la categoría GO

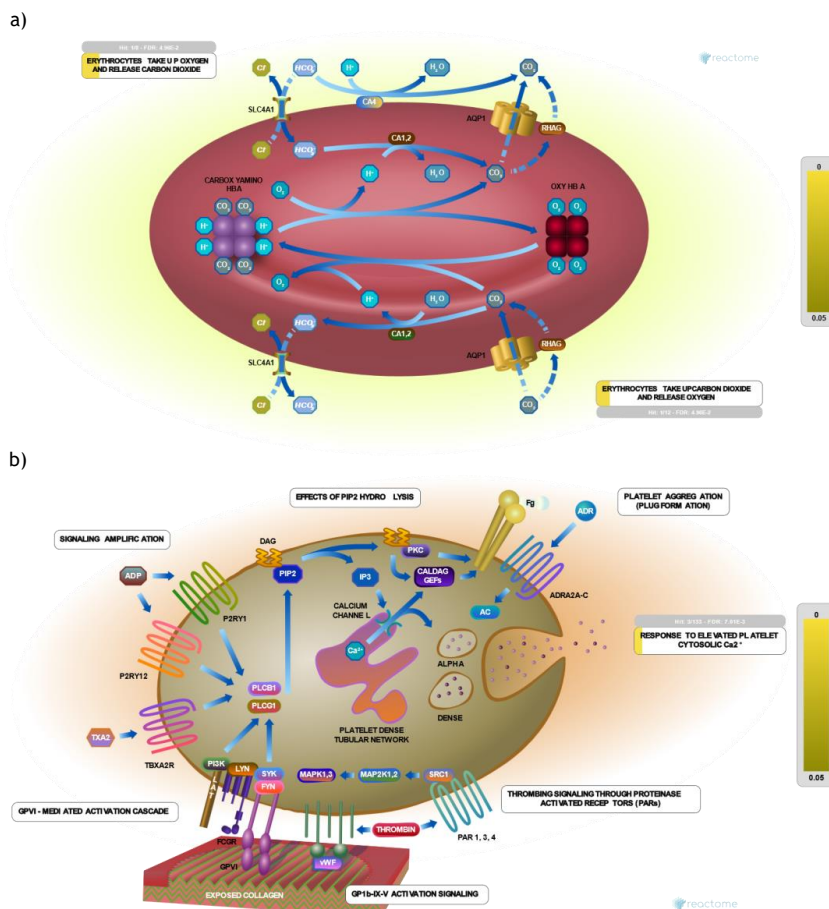


Figura 65. Sobre-representación de las rutas biológicas relacionadas con las proteínas diferencialmente expresadas en el grupo HOP

- a) Proteínas infra expresadas relacionadas a la ruta de intercambio de O₂/CO₂ por los eritrocitos y
 b) La sobre-expresión de proteínas en el grupo HOP relacionada con la ruta de activación y agregación plaquetaria. En amarillo se indica la proporción de la ruta que está representada por las proteínas desreguladas del grupo HOP; y en color gris, la ratio de las proteínas de la ruta y las desreguladas en el grupo HOP ajustado por FDR <0,05. Análisis realizado con la herramienta bioinformática REACTOME [356]

4.4.2.2 Identificación de Proteínas Séricas Diferencialmente Expresadas en la Paciente1 frente al Grupo Control

En la paciente más afectada por la HOP (Paciente1), se identificaron un total de 7 proteínas desreguladas estadísticamente significativas, considerando un P-valor ajustado <0,05 y un Log₂FC >1 o <-1. La sobre-expresión se observó en 3 proteínas mientras que la infra-expresión en tan solo 4 de ellas. (**Figura 66**)

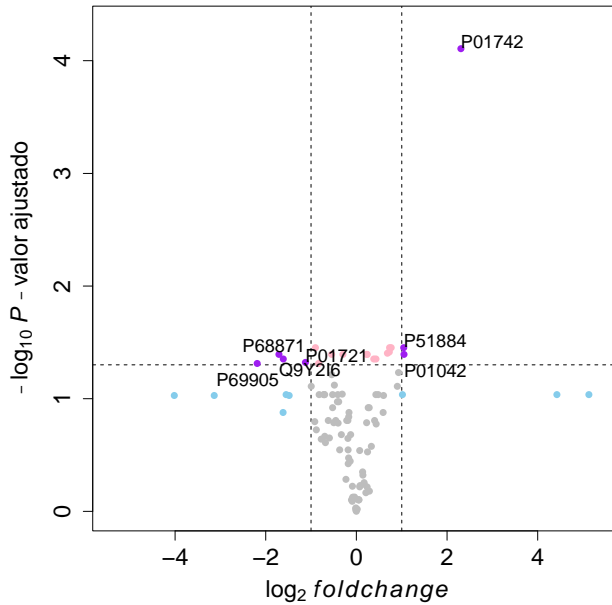


Figura 66. Volcano plot de las proteínas en Paciente1 frente al grupo control

La disregulación proteica en la Paciente1 se refleja en procesos de inmunidad adaptativa (HV169, LV657); en tanto que las proteínas sobre-expresadas forman parte del proceso de coagulación (KNG1) y de la diferenciación de osteoblastos (LUM). Mientras que las proteínas infra-expresadas son parte fundamental en el transporte de oxígeno (HBB, HBA) y en la unión al calcio (NINL). (*Tabla 13*)

Tabla 13. Proteínas diferencialmente expresadas en análisis cuantitativo de Paciente1 vs el grupo Control

Código Uniprot	Código de proteína	Nombre	P-valor ajustado	Log ₂ FC
Proteínas sobre-reguladas en Paciente1				
P01742	HV169	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 1-69	7,82x10 ⁻⁰⁵	2,3057
P01042	KNG1	Cinínógeno-1	4,04x10 ⁻⁰²	1,0494
P51884	LUM	Lumican	3,52x10 ⁻⁰²	1,0442
Proteínas infra-reguladas en Paciente1				
P01721	LV657	Inmunoglobulina lamda variable 6-57	4,76x10 ⁻⁰²	-1,1231
P68871	HBB	Hemoglobina subunidad beta	4,44x10 ⁻⁰²	-1,6120
Q9Y216	NINL	Proteína similar a Ninein	4,04x10 ⁻⁰²	-1,7081
P69905	HBA	Hemoglobina subunidad alfa	4,86x10 ⁻⁰²	-2,1888

4.4.2.2.1 Análisis de sobrerrepresentación de proteínas en Paciente1 frente grupo

Control

Los análisis EGO se realizaron sobre las proteínas diferencialmente expresadas (n=19) de la Paciente1 con respecto al grupo control. Se observó enriquecimiento en 13 procesos biológicos compartido en las proteínas infra-expresadas (n=8) y sobre-expresadas (n=11), los cuales están relacionados mayoritariamente con endocitosis y respuesta inflamatoria; identificamos que el proceso que tuvo un enriquecimiento exclusivo en las proteínas sobre-expresadas fue el de degranulación plaquetaria (**Figura 67a**).

En términos de funciones moleculares se observó un enriquecimiento mayoritario de las proteínas infra-expresadas (n=6) con la unión al antígeno, mientras que las proteínas sobre-expresadas (n=10) se relacionan a la actividad enzimática (**Figura 67b**).

En término de componentes celulares, las proteínas infra-expresadas (n=8) se relacionan mayoritariamente a las micropartículas sanguíneas y al lumen de vesículas, ésta última compartida con las proteínas sobre-expresadas (n=11) quienes además se relacionan con la matriz extracelular (**Figura 67c**).

Las rutas biológicas enriquecidas en mayor proporción por las proteínas infra-expresadas (n=4) son las relacionadas con el intercambio de gases por los hematíes y la eliminación de la hemoglobina del plasma, mismas que comparten relación con las proteínas sobre-expresadas (n=9) quienes además se relacionan con la degranulación plaquetaria (**Figura 68**).

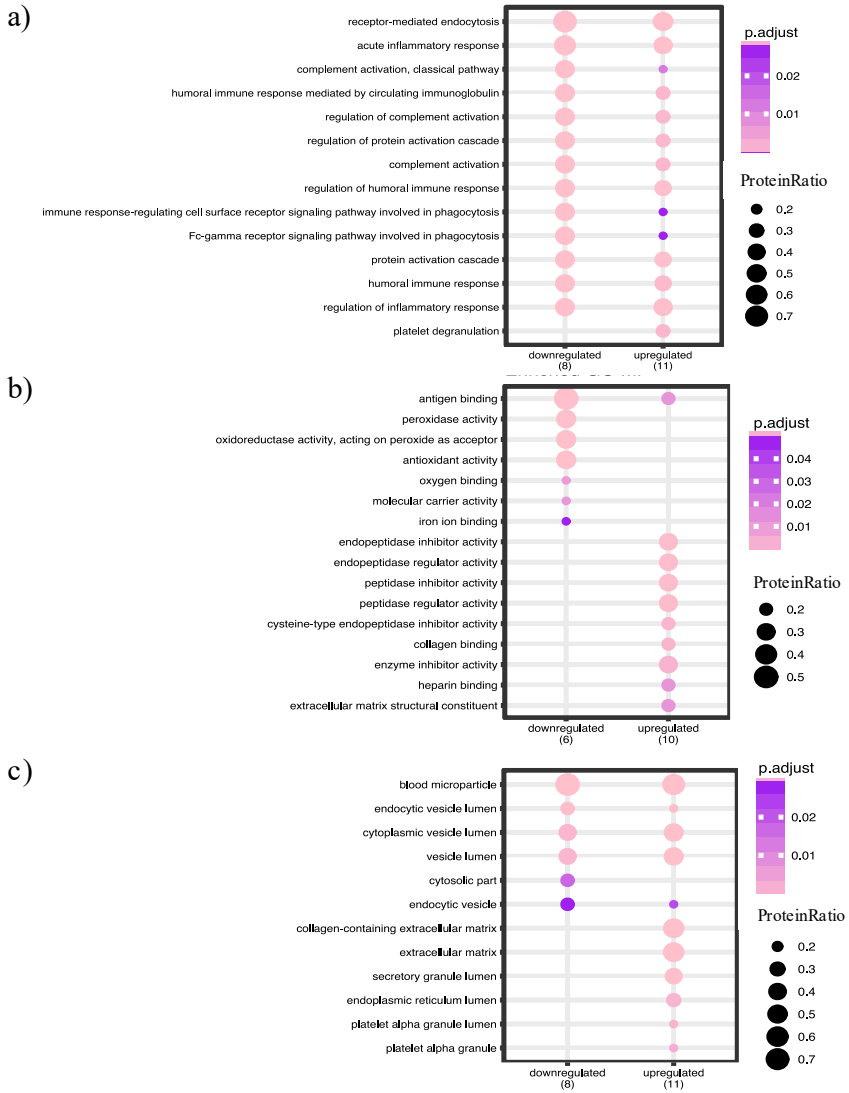


Figura 67. Análisis de enriquecimiento en términos GO de proteínas desreguladas en la Paciente1 vs. el grupo Control
 Se muestran las categorías a) Procesos biológicos, b) funciones moleculares y c) componentes celulares. El código de colores representa los niveles de enriquecimiento: el rosa indica alto enriquecimiento y el morado bajo, P-valor ajustado por BH. El tamaño de los puntos representa la ratio entre las proteínas identificadas en el grupo de estudio y las proteínas totales de la categoría GO

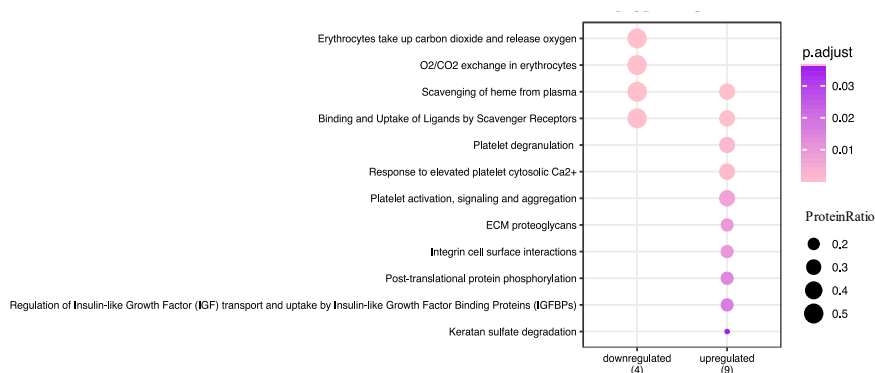


Figura 68. Análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas de las proteínas diferencialmente expresadas en la Paciente1 vs. el grupo control. El código de colores representa los niveles de enriquecimiento: el rosa indica alto enriquecimiento y el morado bajo, P-valor ajustado por BH. El tamaño de los puntos representa la ratio entre las proteínas identificadas en el grupo de estudio y las proteínas totales de las rutas biológicas de la base de datos Reactome

4.4.2.3 Identificación de Proteínas Séricas Diferencialmente Expresadas en la Paciente2 frente al Grupo Control

Se identificaron un total de 13 proteínas desreguladas estadísticamente significativas, considerando un P-valor ajustado $<0,05$ y un $\text{Log}_2\text{FC} >1$ o <-1 en la Paciente2, la menos afectada por la enfermedad, con respecto al grupo control. La sobre-expresión se observó en 8 proteínas mientras que la infra-expresión en 5 de ellas. (**Figura 69**)

La sobre-expresión proteica en la Paciente2 se identificó en proteínas con actividad en la respuesta inmune humoral (HV169, IGHG4); en el transporte de hierro (TRFE); en el proceso de diferenciación de osteoblastos (LUM); en el complemento (CFAB); en la regulación de la mineralización ósea (FETUA); en la reparación de tejidos (AMBP) y con la cascada de coagulación (APOH). (**Tabla 14**)

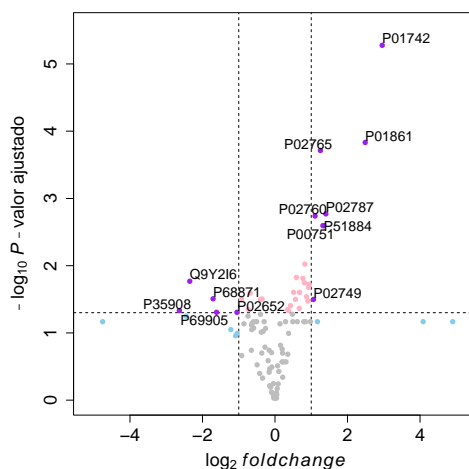


Figura 69. Volcano plot de las proteínas séricas diferencialmente expresadas en la Paciente2 comparada con el grupo control

Tabla 14. Proteínas diferencialmente expresadas en la Paciente2 vs el grupo Control

Acceso Uniprot	Código de proteína	Nombre	P-valor ajustados	Log ₂ FC
Proteínas sobre-expresadas en la Paciente2				
P01742	HV169	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 1-69	5,3x10 ⁻⁰⁶	2,9558
P01861	IGHG4	Inmunoglobulina de cadena pesada constante gama 4	1,5x10 ⁻⁰⁴	2,4869
P02787	TRFE	Serotransferrin	1,7x10 ⁻⁰³	1,4027
P51884	LUM	Lumican	2,5x10 ⁻⁰³	1,3472
P00751	CFAB	Factor de Complemento B	2,5x10 ⁻⁰³	1,3210
P02765	FETUA	Alfa-2-HS-glicoproteína	1,9x10 ⁻⁰⁴	1,2539
P02760	AMBP	Precursor de la alfa-1-microglobulina (AMBP)	1,8x10 ⁻⁰³	1,1048
P02749	APOH	beta-2-Glicoproteína 1	3,2x10 ⁻⁰²	1,0604
Proteínas infra-expresadas en Paciente2				
P02652	APOA2	Apolipoproteína A-II	4,9x10 ⁻⁰²	-1,0484
P69905	HBA	Hemoglobina subunidad alfa	4,9x10 ⁻⁰²	-1,6131
P68871	HBB	Hemoglobina subunidad beta	3,1x10 ⁻⁰²	-1,7083
Q9Y216	NINL	Proteína similar a Ninein	1,7x10 ⁻⁰²	-2,3513
P35908	K2ZE	Queratina tipo II, citoesquelético 2 epidermal	4,6x10 ⁻⁰²	-2,6376

4.4.2.3.1 Análisis de sobrerepresentación de proteínas en Paciente2 frente grupo Control

El análisis EGO en las proteínas diferencialmente expresadas (n=13) de la Paciente2 en términos de procesos biológicos mostró que las proteínas infra-expresadas (n=5) se relacionan mayoritariamente con el transporte de aniones orgánicos, mientras que las proteínas sobre-expresadas (n=8) se relacionan mayoritariamente con la regulación de la respuesta a estímulos y la respuesta aguda inflamatoria (**Figura 70a**).

Las funciones moleculares enriquecidas en las proteínas infra-expresadas (n=5), presentan una asociación mayoritaria a la actividad antioxidante y las proteínas sobre-expresadas (n=7) con actividad enzimática (**Figura 70b**).

La localización de las proteínas infra-expresadas (n=5) como componente celular se vio enriquecida en micropartículas sanguíneas y en lumen de vesículas endocíticas, mismas que se comparten con las proteínas sobre-expresadas (n=8) que además se enriquecen en la misma proporción con la matriz extracelular (**Figura 70c**).

La sobrerepresentación de rutas biológicas de las proteínas infra-expresadas (n=5) mostró una relación mayoritaria en el intercambio de gases en los hematíes y la eliminación de la hemoglobina en plasma. En tanto que las proteínas sobre-expresadas (n=6) se relacionan con mayor proporción a rutas de activación y degranulación de plaquetas (**Figura 71**).

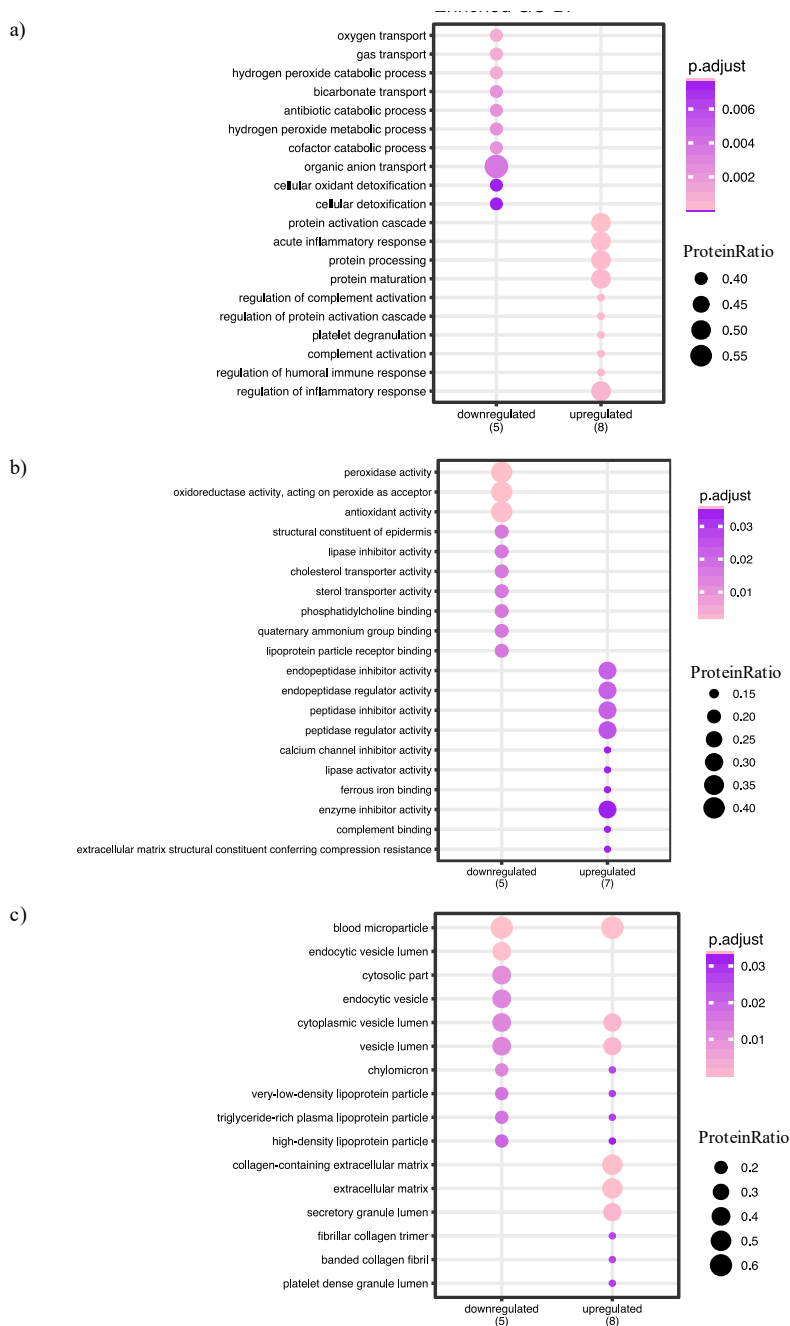


Figura 70. Análisis de enriquecimiento en términos GO de proteínas desreguladas en la Paciente2 vs. el grupo Control.

Se muestran las categorías a) Procesos biológicos, b) funciones moleculares y c) componentes celulares. El código de colores representa los niveles de enriquecimiento: el rosa indica alto enriquecimiento y el morado bajo, P-valor ajustado por BH. El tamaño de los puntos representa el ratio entre las proteínas identificadas en el grupo de estudio y las proteínas totales de la categoría GO

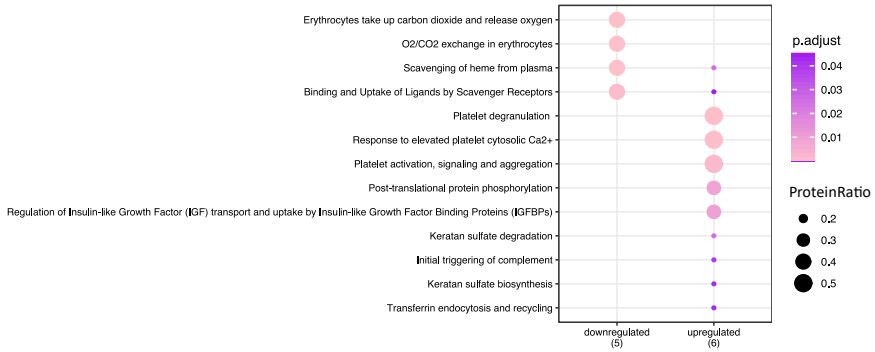


Figura 71. Análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas de las proteínas diferencialmente expresadas en la Paciente2 vs. el grupo control. El código de colores representa los niveles de enriquecimiento: el rosa indica alto enriquecimiento y el morado bajo, P-valor ajustado por BH. El tamaño de los puntos representa la ratio entre las proteínas identificadas en el grupo de estudio y las proteínas totales de las rutas biológicas de la base de datos Reactome

4.4.2.4 Identificación de Proteínas Séricas Diferencialmente Expresadas en la Paciente1 frente a la Paciente2

Comparando los perfiles proteicos entre la Paciente1 y la Paciente2, se identificaron 10 proteínas diferencialmente expresadas estadísticamente significativas, de las cuales 4 proteínas se muestran sobre-expresadas y 6 infra-expresadas. (**Figura 72**).

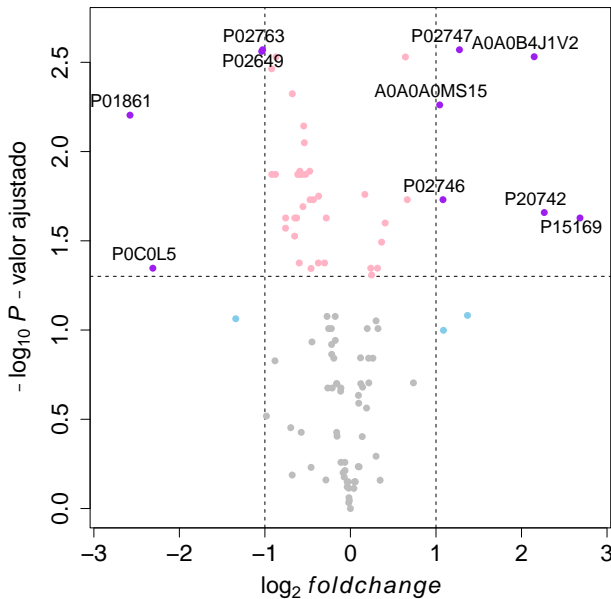


Figura 72. Volcano plot de las proteínas diferencialmente expresadas entre Paciente1 y Paciente2

Las proteínas diferencialmente expresadas participan en procesos biológicos en común, como son la inmunidad humoral y la activación del sistema de complemento, principalmente. Además, se observó sobre-expresión en proteínas con actividad enzimática (PZP) y de respuesta a corticoides (CBPN), en tanto que la infra-expresión se presenta en proteínas de transporte en el torrente sanguíneo (A1AG1) y de unión a lípidos (APOE) (*Tabla 15*).

Tabla 15. Proteínas diferencialmente expresadas entre la Paciente1 y la Paciente2

Acceso Uniprot	Código de proteína	Nombre	P-valor ajustado	Log ₂ FC
Proteínas sobre-expresadas Paciente1 vs Paciente2				
P15169	CBPN	Cadena catalítica de carboxipeptidasa N	2,35x10 ⁻⁰²	2,6841
P20742	PZP	Proteína de la zona del embarazo	2,20x10 ⁻⁰²	2,2659
A0A0B4J1V2	HV226	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 2-26	2,90x10 ⁻⁰³	2,1487
P02747	C1QC	Complemento C1q subcomponente subunidad C	2,70x10 ⁻⁰³	1,2749
P02746	C1QB	Complemento C1q subcomponente subunidad B	1,86x10 ⁻⁰²	1,0815
A0A0A0MS15	HV349	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 3-49	5,50x10 ⁻⁰³	1,0440
Proteínas infra-expresadas Paciente1 vs Paciente2				
P02763	A1AG1	Alfa-1-glicoproteína ácida 1	2,70x10 ⁻⁰³	-1,0381
P02649	APOE	Apolipoproteína E	4,51x10 ⁻⁰³	-2,3107
P0C0L5	CO4B	Complemento C4-B	6,30x10 ⁻⁰³	-2,5778
P01861	IGHG4	Inmunoglobulina de cadena constante gama 4	2,35x10 ⁻⁰²	2,6841

4.4.2.4.1 Análisis de sobrerrepresentación de proteínas en Paciente1 frente a Paciente2

Se identificaron un total de 45 proteínas diferencialmente expresadas entre la Paciente1 y la Paciente2 las cuales fueron enriquecidas en términos GO en dos grupos dependientes del nivel de expresión.

Se observó un enriquecimiento de las proteínas infra-expresadas (n=29) y sobre-expresadas (n=12) en 13 anotaciones en términos de procesos biológicos de los cuales la respuesta inflamatoria presenta mayor proporción de enriquecimiento en ambos grupos de proteínas. La sobre-expresión se identificó en mayor proporción en procesos como la activación de la cascada proteica y en la regulación de procesos inmunológicos (*Figura 73a*).

En términos de funciones moleculares las proteínas diferencialmente expresadas muestran una relación con la actividad enzimática y antioxidante, siendo esta relación mayormente enriquecida en las proteínas sobre-expresadas (n=11). Por otro lado, las proteínas infra-expresadas (n=26) muestran mayor proporción de enriquecimiento con la unión a antígenos (*Figura 73b*).

La relación de las proteínas diferencialmente expresadas con componentes celulares se vio enriquecida mayoritariamente en micropartículas sanguíneas. Las proteínas sobre-expresadas (n=12) además presentaron un enriquecimiento en componentes de matriz extracelular y lumen endoplasmático (*Figura 73c*).

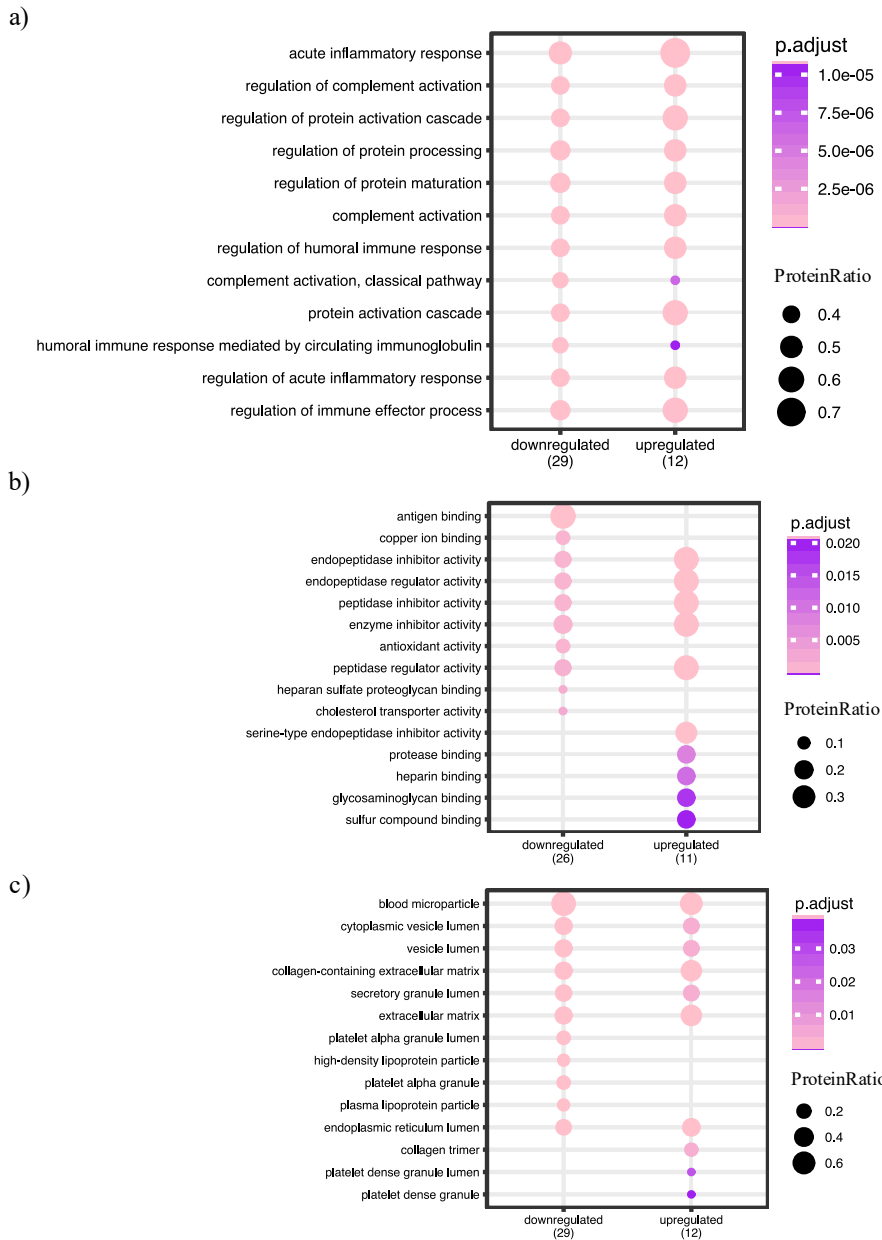


Figura 73. Análisis de enriquecimiento en términos GO de proteínas desreguladas en la Paciente1 vs. Paciente2

Se muestran las categorías a) Procesos biológicos, b) funciones moleculares y c) componentes celulares. El código de colores representa los niveles de enriquecimiento: el rosa indica alto enriquecimiento y el morado bajo, P-valor ajustado por BH. El tamaño de los puntos representa la ratio entre las proteínas identificadas en el grupo de estudio y las proteínas totales de la categoría GO

El enriquecimiento con respecto a rutas biológicas en las proteínas infra-expresadas (n=16) identificó principalmente rutas de degranulación plaquetaria; de regulación en factores de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF, por sus siglas en inglés); y, fosforilación post-traduccional. En tanto que las proteínas sobre-expresadas (n=10) además de compartir relación con las rutas antes mencionadas, se asociaron a la ruta de la cascada del complemento (*Figura 74*)

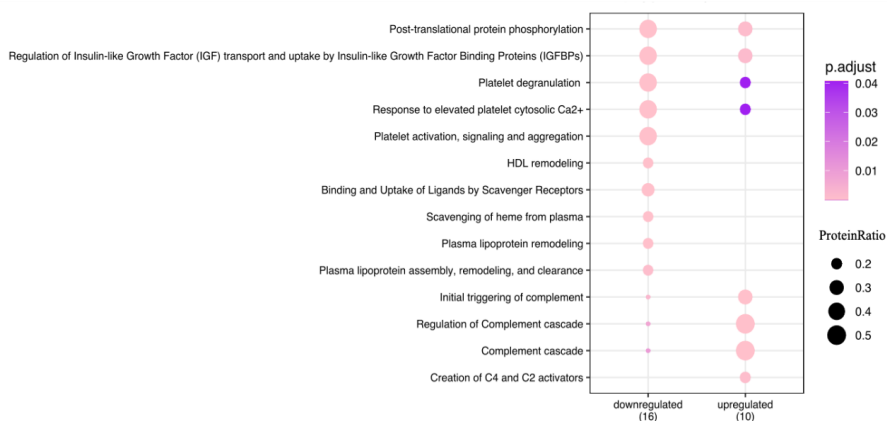


Figura 74. Análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas de las proteínas diferencialmente expresadas en la Paciente1 vs. Paciente2

El código de colores representa los niveles de enriquecimiento: el rosa indica alto enriquecimiento y el morado bajo, P-valor ajustado por BH. El tamaño de los puntos representa la ratio entre las proteínas identificadas en el grupo de estudio y las proteínas totales de las rutas biológicas de la base de datos Reactome

4.5 CAPÍTULO 5. ESTUDIOS *IN VITRO* EN EL ENTORNO DE LA HETEROPLASIA ÓSEA PROGRESIVA

4.5.1 Establecimiento de cultivos celulares primarios

Se establecieron los cultivos primarios a partir de tejidos (hueso, osificación y grasa) obtenidos tanto de controles sanos sin HOP, como de la Paciente1, mediante los métodos estandarizados de explante y digestión enzimática.

Obtuvimos los cultivos: i) osteoblastos “*like*” de hueso control (Ob_{Ctrl}), hueso sano de Paciente1 (Ob_{sano}) y de osificación (Ob_{osif}); ii) Fibroblastos de piel control (Fb_{Ctrl}), piel sana de la Paciente1 (Fb_{sano}) y piel adyacente a una osificación (Fb_{ady}); iii) pre-adipocitos sanos (pre-Adp_{sano}) y pre-adipocito adyacente a una osificación (pre-Adp_{ady}).

Como se observa en la **Figura 75**, cada cultivo específico mantiene la morfología independientemente de la zona de origen de la que provienen, se observa una morfología propia de células precursoras con similitudes de tejido mesenquimal el cual corresponde con su estirpe.

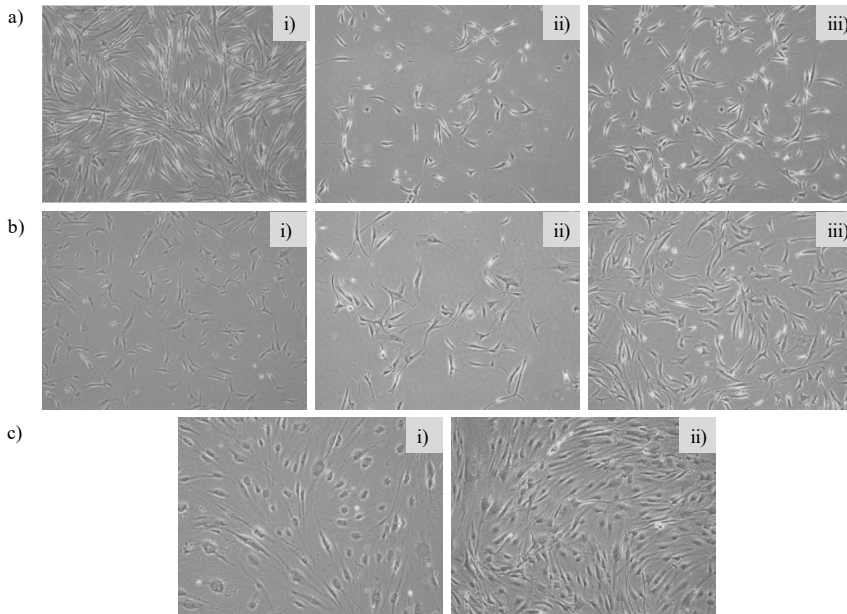


Figura 75. Cultivos primarios

- a) Fibroblastos aislados de: i) Piel de paciente control, ii) Piel sana de la Paciente1, iii) Piel adyacente a osificación de Paciente1;
- b) Osteoblastos “*like*” aislados de: i) Hueso de paciente control, ii) Hueso sano de la Paciente1, iii) osificación de Paciente1.
- c) Pre-adipocitos aislados de: i) Grasa sana de Paciente1, ii) Grasa adyacente a osificación de Paciente1

4.5.2 Detección de la proteína Gs- α en cultivos primarios

Siendo la mutación en el gen GNAS la causa de HOP (OMIM# 166350) y debido a que el producto principal de este gen es la proteína Gs-alfa (Gs- α) [110] se realizó un inmunomarcaje tanto en las células controles como en las células procedentes de la Paciente1, que permitan realizar análisis semicuantitativos del contenido proteico de Gs- α .

En el análisis de los resultados del *Western Blot* se observaron dos bandas en todas las muestras analizadas, las cuales corresponden a la proteína Gs- α con un peso molecular de 46 kDa y a una de sus isoformas con un peso molecular de 44 kDa. Además, se visualizó la proteína endógena Vinculina con un peso molecular de 130 kDa, la cual se utilizó como control de carga (**Figura 76**).

La semi cuantificación de la proteína Gs- α y su isoforma se realizó normalizando la intensidad de las bandas con respecto a su control de carga (Vinculina). Se observó una diferencia de expresión relativa de la proteína Gs- α y su isoforma, siendo esta última la mayormente expresada en todos los cultivos primarios.

Por otro lado, los resultados sugieren una diferencia de expresión dependiendo el origen tisular de los cultivos primarios, siendo los fibroblastos (Fb) los que mostraron mayor expresión de la proteína Gs- α y su isoforma comparada con los cultivos osteoblásticos y pre-adipocíticos.

Además, la expresión de la proteína Gs- α de 46 kDa se observó disminuida en los Fb_{ady} con respecto a los Fb_{sanos} y Fb_{Ctrl}, los cuales presentaron una expresión similar de la proteína. La isoforma de 44 kDa presentó un patrón de expresión ligeramente decreciente, teniendo el mayor nivel los Fb_{Ctrl}, seguido de los Fb_{sanos} y el nivel más bajo se lo presentaron en los Fb_{ady} (**Figura 76a**).

Los osteoblastos de cultivo primario mostraron mayor expresión de la isoforma que de la proteína Gs- α . La expresión de la isoforma se observó incrementada en los Ob_{Ctrl} comparado con los osteoblastos de la Paciente1 entre los cuales la mayor expresión de isoforma se observó en los Ob_{osif}. Con respecto a la expresión de la proteína Gs- α se observó mayor expresión en los osteoblastos de la Paciente1 que en los Ob_{Ctrl} y, entre las células de la Paciente1, la menor expresión se observó en los Ob_{osif} (**Figura 76b**).

Los pre-adipocitos primarios de la Paciente1 mostraron expresión similar de la proteína Gs- α y expresión diferencial en la isoforma, siendo para esta menor la expresión de los pre-Adp_{ady} con respecto a los pre-Adp_{sanos} (**Figura 76c**).

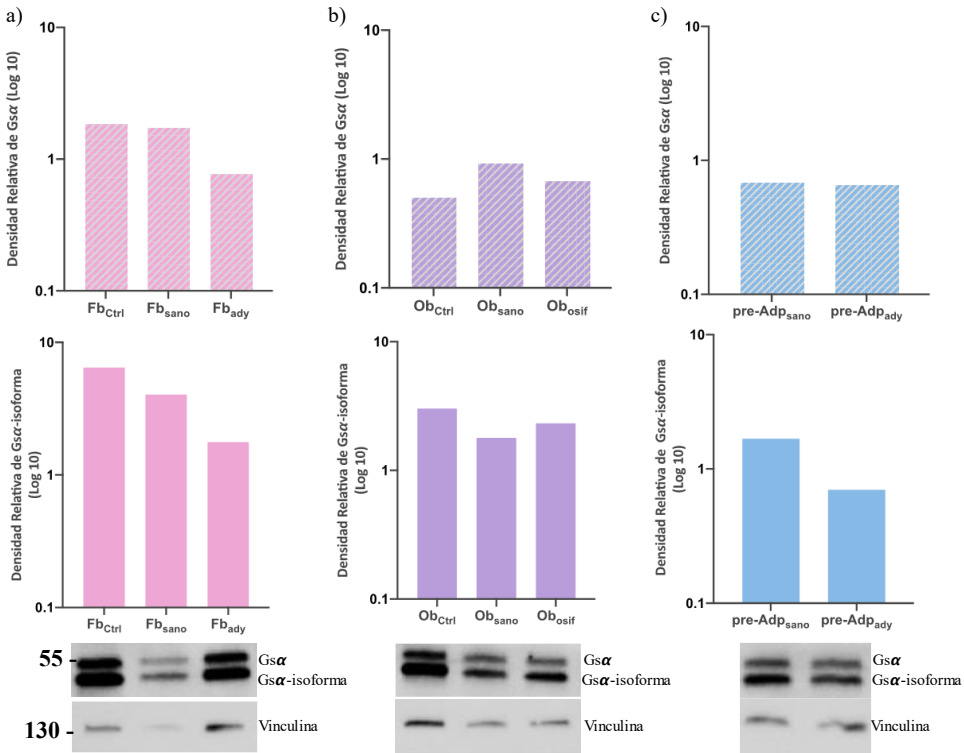


Figura 76. Niveles relativos de expresión de la proteína Gs- α (46 kDa) y de su isoforma (44 kDa) En: a) fibroblastos control (Fb_{Ctrl}), de piel sana de Paciente1 (Fb_{sanos}) y de piel adyacente a osificación de la Paciente1 (Fb_{ady}); b) osteoblastos “like” de control (Ob_{Ctrl}), sanos de hueso de Paciente1 (Ob_{sanos}) y de osificación de Paciente1; c) pre-adipocitos de grasa de Paciente1 (pre-Adp_{sano}) y de grasa adyacente a la osificación (pre-Adp_{ady}). Los datos fueron normalizados con respecto a la proteína endógena Vinculina

4.5.3 Localización de la proteína Gs- α en cultivos primarios mediante inmunofluorescencia

Realizamos un inmunomarcaje utilizando el anticuerpo anti-GNAS. Localizamos la proteína Gs- α y una de sus isoformas en los cultivos primarios aislados de tejidos controles y de la Paciente1. La expresión se visualizó y cuantificó por la señal de fluorescencia emitida por la proteína marcada.

La proteína Gs- α (y su isoforma de 44 kDa) se localizó en el citoplasma y membrana de todas las células de cultivo primario. Observamos mayor expresión de la proteína en los fibroblastos en comparación con la observada en las células osteoblásticas y adipocíticas.

Del grupo de fibroblastos primarios (control, sano y adyacentes), observamos la mayor expresión de la proteína en los Fb_{Ctrl}, presentando una mayor intensidad de fluorescencias, mientras que la menor intensidad la mostraron en los Fb_{ady} (**Figura 77**).

El análisis fluorescente de las células osteoblásticas mostró intensidades similares de la proteína Gs- α entre los Ob_{Ctrl} y Ob_{osif} siendo los Ob_{sanos} en los que se observa menor intensidad de proteína marcada (**Figura 78**).

Las células adipocíticas muestran la mayor expresión de proteína marcada en las células pre-Adip_{sanos} con respecto a las pre-Adip_{ady} las cuales presentan baja expresión (**Figura 79**).

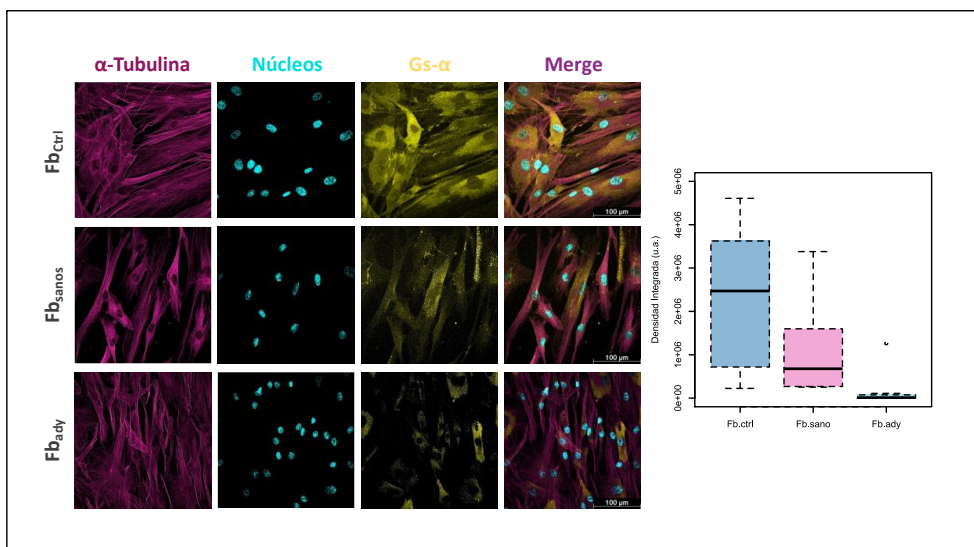


Figura 77. Localización y cuantificación de la proteína Gs- α en fibroblastos control (Fb_{Ctrl}), fibroblastos sanos (Fb_{sanos}) y fibroblastos adyacentes a la osificación (Fb_{osif}) Imágenes a un aumento 40X. Cuantificación de fluorescencia realizada en *software ImageJ*

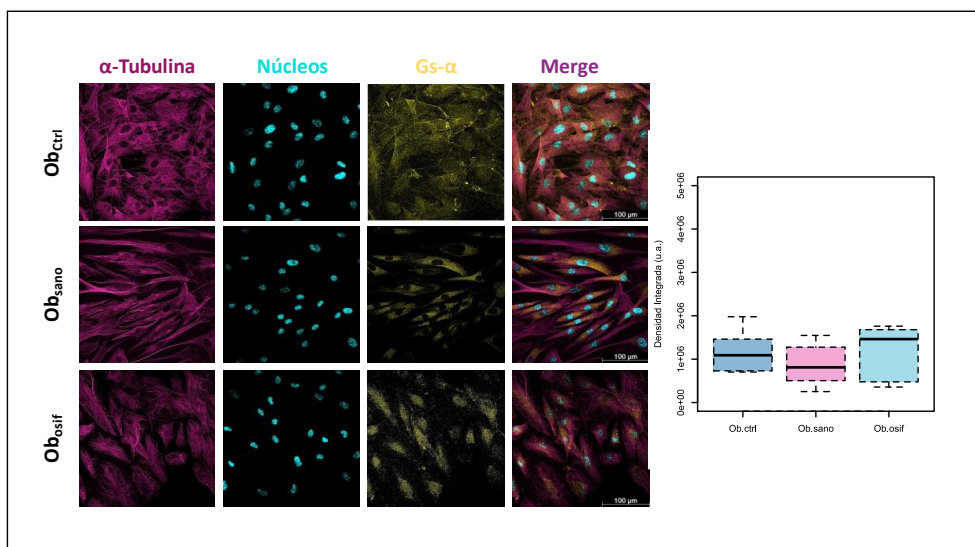


Figura 78. Localización y cuantificación de la proteína Gs- α en osteoblastos control (Ob_{Ctrl}), sanos (Ob_{sanos}) y de osificación (Ob_{osif}). Imágenes a un aumento 40X. Cuantificación de fluorescencia realizada en *software ImageJ*

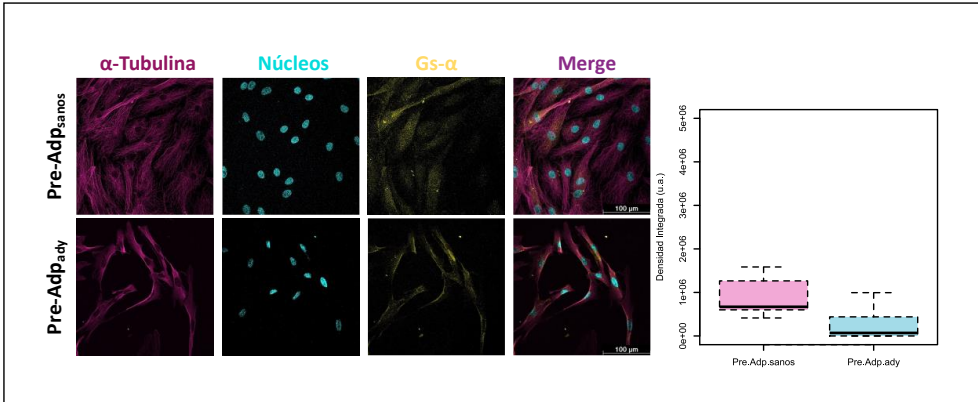


Figura 79. Localización y cuantificación de la proteína Gs- α en pre-adipocitos De grasa sana (pre-Adp_{sano}) y adyacente a osificación (pre-Ady_{osif}). Imágenes a un aumento 40X. Cuantificación de fluorescencia realizada en *software* ImageJ

4.5.4 Caracterización de los osteoblastos “like” primarios durante la diferenciación

Para determinar la condición pre-diferencial y la capacidad de diferenciación (*commitment*) de los osteoblastos “like” obtenidos de hueso control (Ob_{Ctrl}) y osificación (Ob_{osif}), se indujo la diferenciación osteogénica durante 21 días (**Figura 80**) y se cuantificó la expresión de los marcadores osteogénicos: i) *ALPL*; ii) proteína ácida rica en cisteínas (*SPARC1*); iii) osteopontina (*SPPI*). Y de los marcadores adipogénicos: i) adiponectina (*ADIPOQ*) y ii) Proteína de unión a ácidos grasos (*FBP4*).

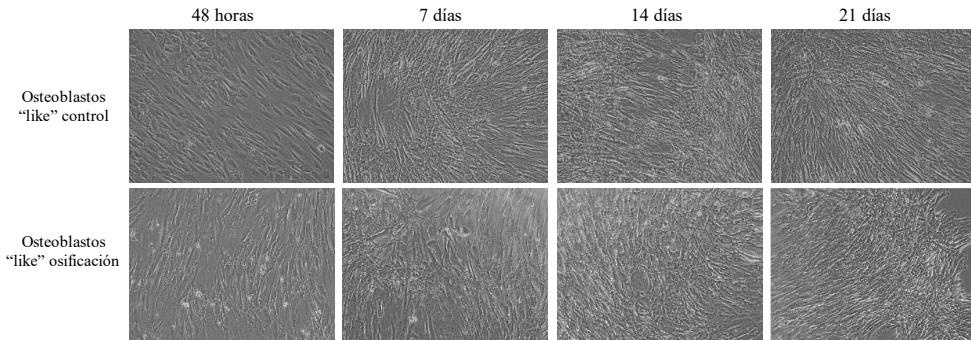


Figura 80. Morfología de los osteoblastos de cultivo primario de hueso control y de osificación durante la diferenciación osteogénica. Imágenes obtenidas con microscopio invertido y aumento de 10X.

Los marcadores osteogénicos y adipogénicos se observaron diferencialmente expresados entre los osteoblastos de osificación (Ob_{osif}) y los osteoblastos control (Ob_{Ctrl}). Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del día 1 durante la diferenciación de los Ob_{Ctrl}.

Los niveles de expresión de *RUNX2* y *SPARC1* durante la diferenciación de los Ob_{Ctrl} se observan disminuidos durante el día 7, incrementados al día 14 y alcanzando los niveles de expresión cercanos a los iniciales en el día 21. *SPPI* u Osteopontina, aumenta ligeramente sus

niveles de expresión durante los primeros 7 días y disminuye progresivamente al día 14 hasta su valor más bajo, al final de la diferenciación. El marcador *ALPL* muestra los niveles de expresión más altos durante el día 7 de la diferenciación, disminuyendo al día 14 y manteniendo esos niveles hasta el día 21 (**Figura 81a**).

Durante la diferenciación de los Ob_{osif} , encontramos niveles de expresión disminuidos del marcador *RUNX2* durante los días 1 y 21 y aumentados a los 7 y 14 días. La expresión de *SPARC1* se observó ligeramente disminuida al inicio de la diferenciación, su máximo nivel de expresión ocurre durante el día 7, y tiene una disminución progresiva a los 14 y 21 días. La diferencia en la expresión del marcador *SPP1* mostró los niveles más altos al día 7 de la diferenciación, disminuyendo progresivamente hasta el día 21, expresando los mismos niveles que en los Ob_{ctr} . *ALPL* se expresó aumentado al día 7 disminuyendo ligeramente al día 14 y 21 (**Figura 81b**).

En cuanto a los marcadores adipogénicos en los Ob_{ctr} , *ADIPOQ* se observa inhibido al día 7 y 21, incrementando sus niveles al día 14 de la diferenciación. Niveles bajos de expresión del marcador *FBP4* se identificaron durante el día 7, y aún más bajos en el resto de las etapas. En la diferenciación de los Ob_{osif} *ADIPOQ* tiene niveles de expresión más bajos durante todas las etapas, mientras que los niveles más altos de expresión observados en los Ob_{osif} fueron del marcador *FBP4* al día 1 de la diferenciación, disminuyendo progresivamente al día 21 (**Figura 82**).

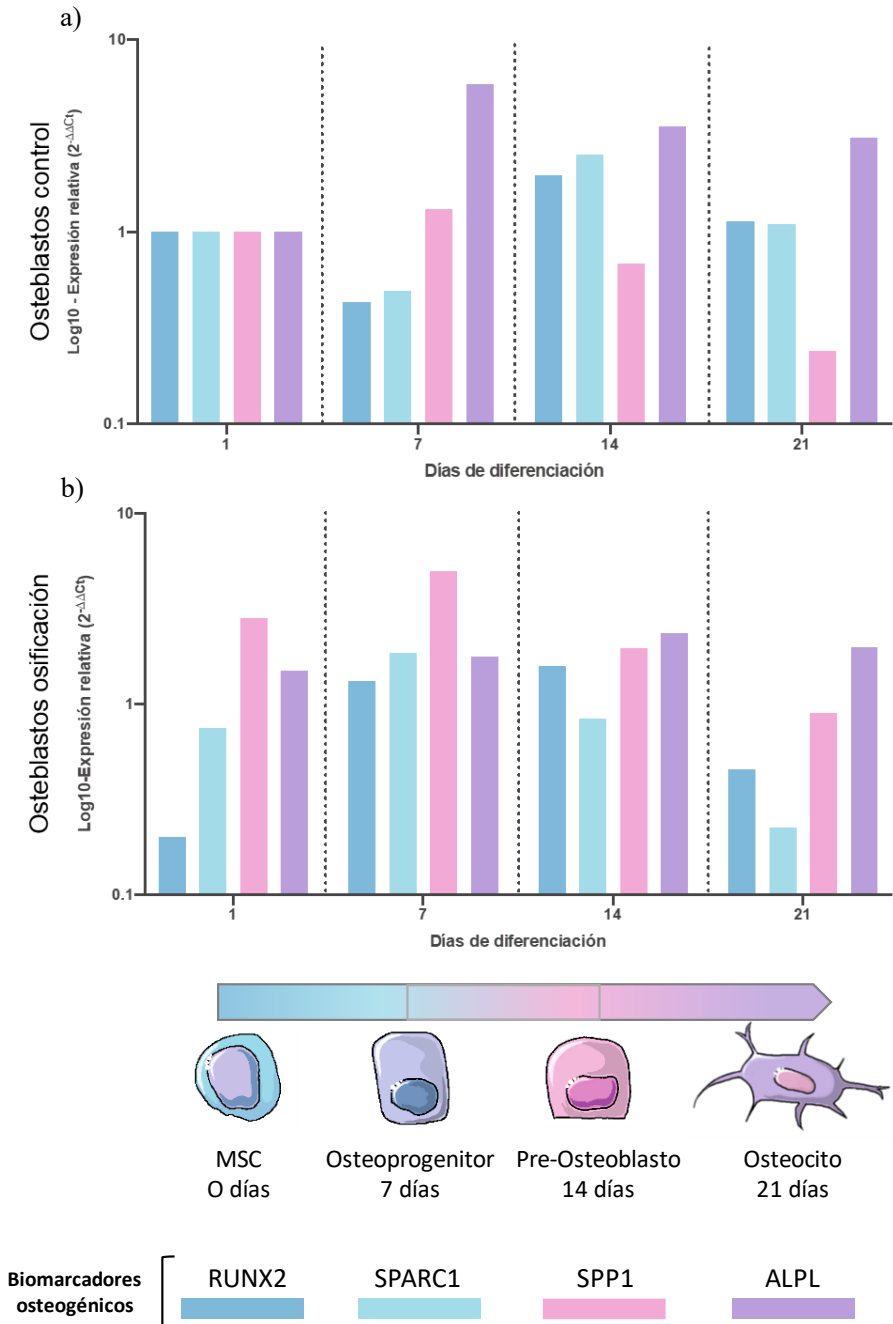


Figura 81. Expresión cuantitativa mediante qPCR de biomarcadores osteogénicos durante la diferenciación. Niveles de expresión de los marcadores osteogénicos *RUNX2* (azul), *SPARC1* (cian), *SPP1* (rosa) y *ALPL* (morado) durante la diferenciación en osteoblastos “like” a) de hueso control y b) de osificación de la Paciente1. Los datos de expresión de cada gen se normalizaron con respecto a la expresión del gen endógeno *GAPDH*.

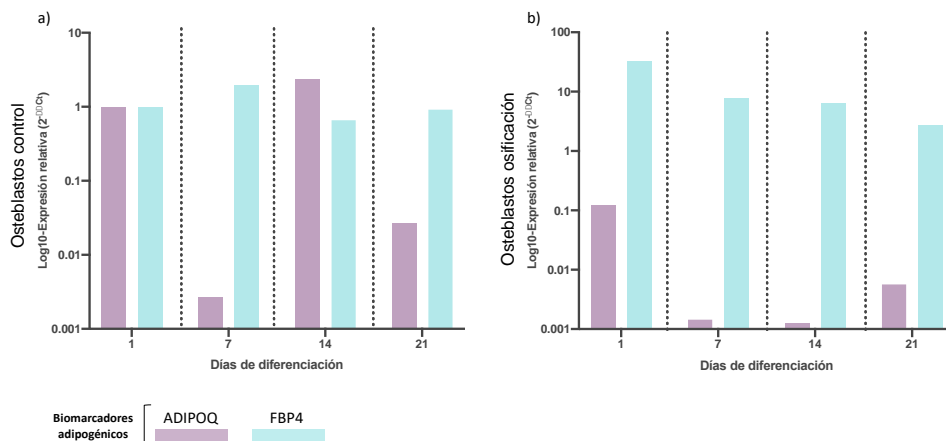


Figura 82. Expresión de marcadores adipogénicos durante la diferenciación osteogénica. Niveles de expresión de a) Adiponectina (*ADIPOQ*) y b) Proteína de unión de ácidos grasos (*FBP4*) en osteoblastos “like” de hueso control y osificación. Se representan los datos normalizados con respecto al gen endógeno *GAPH*

4.5.5 Ensayos farmacológicos en cultivos primarios de paciente con HOP

El uso de modelos celulares para el estudio de las enfermedades permite identificar dianas terapéuticas y evaluar su eficacia. En este trabajo se realizaron distintos ensayos *in vitro* de eficacia farmacológica con osteoblastos “like” obtenidos de osificación de la Paciente1 dirigidas a rutas de señalización conservada en la HOP.

4.5.5.1 Determinación de dosis farmacológicas experimentales en osteoblastos “like” de cultivo primario

Las dosis inhibitorias de cada una de las terapias administradas a los osteoblastos primarios fueron determinadas midiendo la expresión diferencial de genes involucrados en las rutas mTOR (*mTOR*), Wnt (*AXIN2*), Hedhog (*Hh*) (*GLII*) entre las células tratadas y las no tratadas a las 72 horas de tratamiento.

De las dosis probadas del inmunosupresor Everolimus los niveles más bajos de expresión de mTOR se observaron con la dosis de 100nM (**Figura 83a**), la disminución observada a una dosis de 10.000 nM se relaciona con la muerte celular y no por el efecto inhibitorio de mTOR sobre la expresión de mTOR. La disminución en los niveles de expresión de GLII se observaron a una dosis de 5 nM del antineoplásico Vismodegib (**Figura 83b**). Mientras que los osteoblastos tratados con 100 ng/ml de la proteína Esclerostina mostraron la mayor disminución en la expresión de AXIN2 (**Figura 83c**).

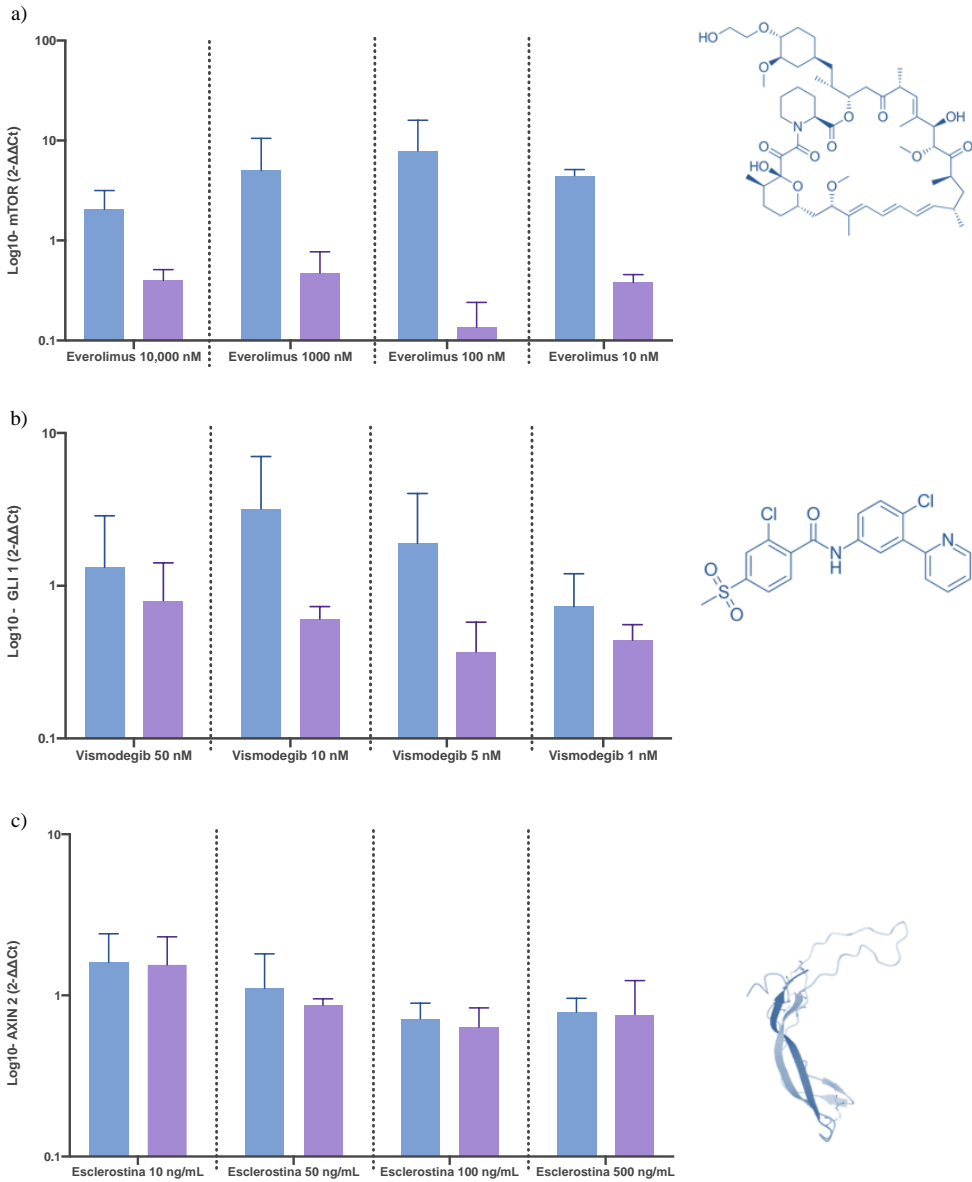


Figura 83. Expresión relativa de genes de rutas conservadas en la HOP bajo inducción terapéutica a) Expresión relativa de *mTOR* en osteoblastos tratados con diferentes dosis de Everolimus, b) Expresión relativa de *GLI1* durante el tratamiento con Vismodegib. c) Expresión relativa de *AXIN2* durante el tratamiento con Esclerostina. Las cuantificaciones se realizaron a las 48 y 72 horas post-tratamiento. Datos normalizados con respecto al gen endógeno *HMGB1*. Se muestra la media con la desviación estándar. A la derecha de cada gráfico se observa la estructura molecular de cada tratamiento.

4.5.5.2 Efecto farmacológico en osteoblastos “like” durante la diferenciación osteogénica

Se observaron los cambios morfológicos en los osteoblastos “like” durante la diferenciación osteogénica en presencia de los tratamientos y con respecto a los no tratados.

Todas las células muestran morfología similar durante la primera etapa de la diferenciación del día 1 al 7, se observan formación de redes celulares y en los osteoblastos tratados se evidencia muerte celular durante los días 14 y 21 comparado con los no tratados en los que se observa una proliferación mayor (**Figura 84**).

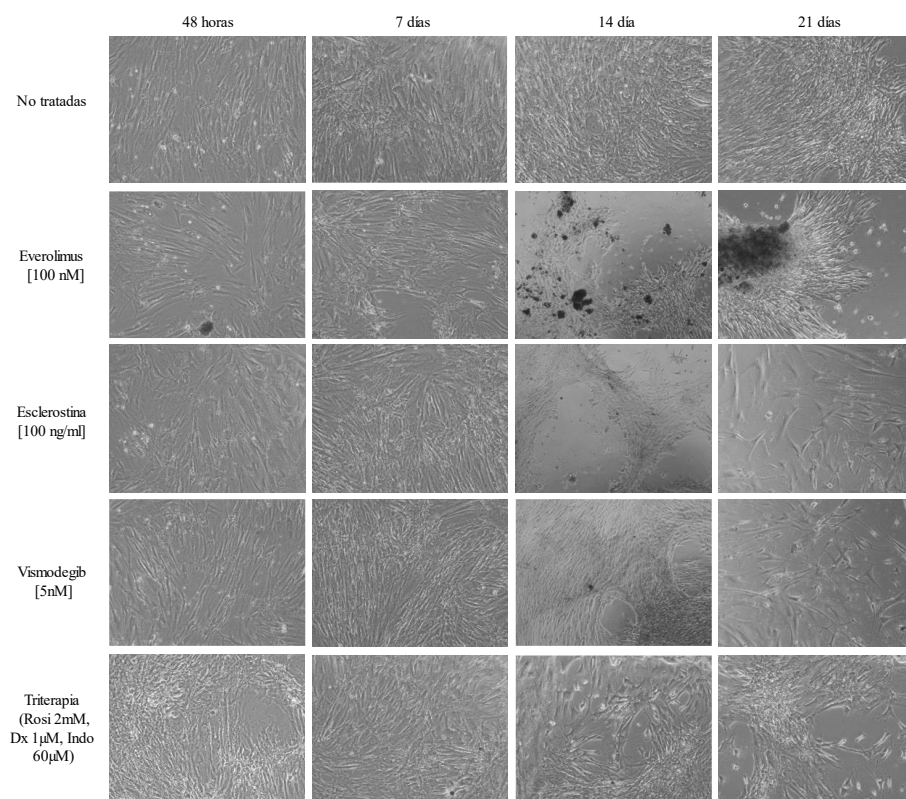


Figura 84. Representación morfológica de osteoblastos “like” tratados con los diferentes fármacos durante los días 1, 7, 14 y 21 de inducción a la diferenciación osteogénica.

4.5.5.3 Niveles de expresión de marcadores osteogénicos durante el proceso de diferenciación en respuesta al tratamiento

En el análisis se incluyeron 23 transcritos involucrados tanto en las etapas de la diferenciación osteogénica como en rutas de señalización conservadas en la HOP. Obtuvimos una cuantificación de los niveles de expresión por encima del *background* para 18 de ellos. El aumento o disminución en los niveles de expresión de los transcritos analizados se consideró relevante para valores de $\text{Log}_2\text{FC} > |1|$. Los transcritos sin diferencia en los niveles de expresión se muestran en el **ANEXO 16**.

4.5.5.3.1 Efecto de Everolimus durante la diferenciación osteogénica

Durante el día 7 de la diferenciación osteogénica con el tratamiento Everolimus, observamos un aumento en la expresión de *DKK1* con un $\log_2FC=1,98$ con respecto a las células no tratadas (**Figura 85a**) y de *OPG* con un $\log_2FC=1,46$ (**Figura 85b**). Al día 14 observamos una disminución de la expresión de *IL6R* con un $\log_2FC= -2,67$ que, posteriormente durante la maduración de los osteoblastos al día 21, la expresión de *IL6R* se ve de nuevo incrementada con un $\log_2FC=1$. Sin embargo, se observó una disminución de la expresión del gen *SMOC1* frente a las células no tratadas a los 21 días ($\log_2FC= -1$) (**Figura 85d**).

Desde el inicio de la diferenciación observamos una disminución de la expresión de Leptina con respecto a la expresión en las células no tratadas, mostrando valores de $\log_2FC= -2,46$, al día 7 los niveles más bajos de expresión con un $\log_2FC= -3,43$ y un $\log_2FC= -3$ el día 14 (**Figura 85e**).

4.5.5.3.2 Efecto de Vismodegib durante la diferenciación osteogénica

El tratamiento Vismodegib alteró los niveles de expresión al inicio de la diferenciación con niveles aumentados del marcador i) *COL1A1* con valor de $\text{Log}_2FC=1,36$ disminuyendo los niveles al día 14 y 21 con valores de $\text{Log}_2FC= -1,06$ y $-2,86$ respectivamente; ii) *IL6R* con un $\text{Log}_2FC= 1,55$ disminuyendo drásticamente al día 14 con un $\text{Log}_2FC= -2,55$, para finalmente aumentar en la etapa de maduración osteogénica con un $\text{Log}_2FC= 1,51$ (**Figura 85c**); iii) *SMOC1* con niveles incrementados al día 1 y al día 14 con valores de $\text{Log}_2FC= 1,49$ y $1,53$ respectivamente (**Figura 85d**); iv) *OPG* mostró un aumento de al día 1 con $\text{Log}_2FC= 1,51$ disminuyendo dramáticamente al día 14 con un $\text{Log}_2FC= -3,10$ (**Figura 85b**); v) *ALPL* disminuida al día 14 con un $\text{Log}_2FC= -2,03$ y un incremento en la expresión ($\text{Log}_2FC= 1,01$) al día 21 de la diferenciación (**Figura 85g**); vi) *AXIN2* infra-expresado con un $\text{Log}_2FC= -1,74$ al día 14 y $\text{Log}_2FC= 1,33$ al día 21 de la diferenciación (**Figura 85h**); vii) *OPG* con niveles aumentados durante los días 1 y disminuidos al día 14 con valores de $\text{Log}_2FC= 1,51$ y $-3,10$ respectivamente (**Figura 85b**); viii) *NAMPT* con una disminución de la expresión al día 14 con un $\text{Log}_2FC= -1,27$ (**Figura 85i**) y ix) *RUNX2* también mostró una disminución en la expresión al día 14 con un $\text{Log}_2FC= -1,65$ con respecto a la diferenciación sin tratamientos (**Figura 85j**).

La expresión de Leptina se observó alterada durante casi todo el proceso de diferenciación con Vismodegib, al día 1 los niveles de expresión se observaron incrementados con un $\text{Log}_2FC= 2,20$ veces, al día 14 la expresión disminuyó notable con un $\text{Log}_2FC= -3,4$ veces finalizando el proceso al día 21 con niveles incrementados con un $\text{Log}_2FC= 1,23$ veces con respecto a la diferenciación sin tratamiento (**Figura 85e**).

4.5.5.3.3 Efecto de Esclerostina durante la diferenciación osteogénica

Durante la diferenciación osteogénica con el tratamiento Esclerostina, observamos alteraciones en la expresión de los marcadores a partir del día 14, mostrando niveles disminuidos de i) *DKK1* con un $\log_2FC= -1,12$ veces (**Figura 85a**) y ii) Leptina con un $\text{Log}_2FC= -3,27$ veces menos que en la diferenciación sin tratamiento (**Figura 85e**). Durante la etapa de maduración osteoblástica (día 21) la expresión de Leptina se mantuvo disminuida con $\text{Log}_2FC= -1,03$ (**Figura 85e**); durante la misma etapa, el marcador *COL1A* mostró niveles disminuidos con $\text{Log}_2FC= -1,53$ (**Figura 85f**), mientras que la expresión de *NAMPT*, *IL6R*, *SMOC* y *OPG* se observaron incrementadas con un $\text{Log}_2FC= 2,52$; $1,15$; $1,25$ y $1,30$ respectivamente (**Figura 85i**, **85c**, **85d**, **85b**). Todos ellos comparados contra la diferenciación sin tratamiento.

4.5.5.3.4 Efecto de una Triterapia (Rosiglitazona, Dexametasona e Indometacina) durante la diferenciación osteogénica

La triterapia mostró tener un efecto sobre la diferenciación osteogénica induciendo un cambio en la expresión de los marcadores: i) NAMPT aumentado con un $\text{Log}_2\text{FC}= 1,33$ al día 1 y manteniéndose en los mismos niveles hasta el día 7 pero disminuyendo al día 14 con un $\text{Log}_2\text{FC}= -1,34$ **Figura 85i**); iii) PPARG incrementado con un $\text{Log}_2\text{FC}=1,36$ y 1,17 durante los días 1 al 7 de la diferenciación, disminuyendo al día 14 con un $\text{Log}_2\text{FC}= -1,04$ **Figura 85l**); iv) los niveles de *SMO1* se observaron incrementados al día 1 con un $\text{logFC}= 1,66$ y para el día 21 se observó disminuido con un $\text{Log}_2\text{FC}= -1,24$ veces (**Figura 85d**) v) *PLIN2* mostró niveles aumentados durante los días 1, 7 y 21 con valores de $\text{Log}_2\text{FC}= 2,02$; 2,32 y 2,06 respectivamente **Figura 85k**); vi) *ALPL* aumentada con un $\text{Log}_2\text{FC}= 2,11$ al día 7 de la diferenciación y con un $\text{Log}_2\text{FC}= 2,03$ veces al día 21 (**Figura 85g**); v) *OPG* se observó incrementada al día 7 con un $\text{Log}_2\text{FC}= 1,39$ disminuyendo durante la siguiente etapa de diferenciación (día14) con un $\text{Log}_2\text{FC}= -2,05$ **Figura 85b**); vii) la expresión de *PLIN2* está incrementada desde el día 7 al día 21 de la diferenciación con un $\text{Log}_2\text{FC}= 1,51$, 1,21 y 2,12 veces, respectivamente (**Figura 85k**); viii) *RUNX2* se observó disminuido en el día 14 con un $\text{Log}_2\text{FC}= -1,45$ comparado con las células diferenciadas no tratadas (**Figura 85j**); ix) *ADIPOQ* mostró niveles de expresión notablemente incrementados desde el día 7 hasta el día 21 con valores de $\text{Log}_2\text{FC}= 7,22$; 6,52 y 6,71 respectivamente, siendo el marcador con mayor la expresión observada (**Figura 85m**).

Tanto *DKK1* como *LEP* sufrieron cambios durante toda la diferenciación con la triterapia. *DKK1* mostró un incremento moderado de la expresión durante los días 1 y 7 con un valor de $\text{log}_2\text{FC}= 1,18$ y 1,35, disminuyendo al día 14 ($\text{log}_2\text{FC}= -2,04$) para terminar incrementando de nuevo sus niveles en la maduración celular ($\text{log}_2\text{FC}= 1,86$; **Figura 85a**); mientras que *LEP* inició el proceso de diferenciación mostrando valores de expresión más bajos que en las células no tratadas ($\text{log}_2\text{FC}= -1,02$) para aumentar sus valores de expresión durante los días 7, 14 y 21 con valores de $\text{log}_2\text{FC}= 2,16$; 1,70; 4,16 respectivamente (**Figura 85e**).

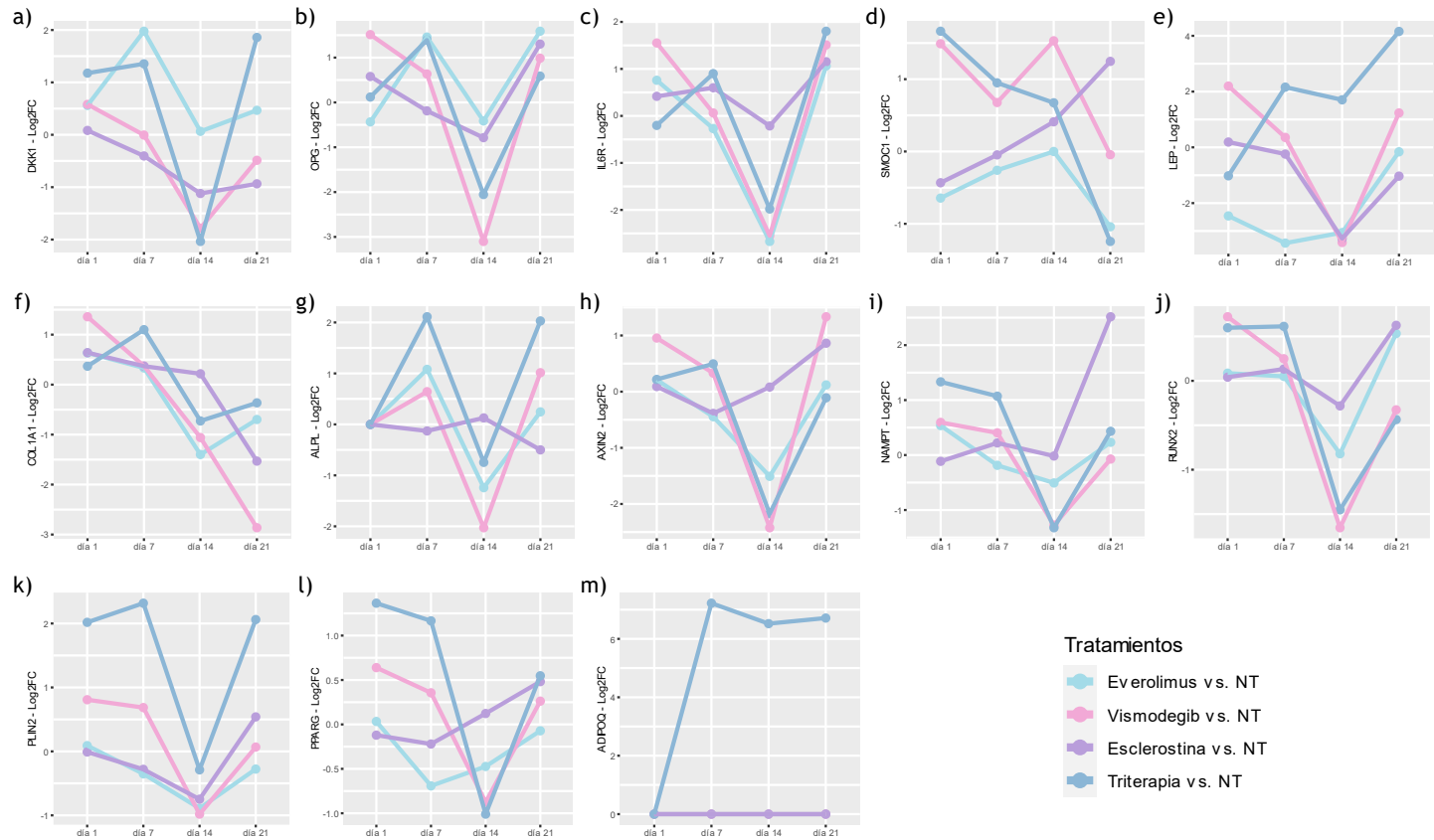


Figura 85. Análisis de expresión de marcadores osteogénicos durante la diferenciación en respuesta a distintos tratamientos. Expresión de los marcadores: a) DKK1; b) OPG/TNFRSF11B; c) IL6R; d) SMCC1; e) LEP; f) COL1A1; g) ALPL; h) AXIN2; i) NAMPT; j) RUNX2; k) PLIN2; l) PPARG; m) ADIPOQ; en respuesta a Everolimus [100nM] (cian), Vismodegib [5nM] (rosa), Esclerostina [100nM] (morado) y triterapia [Rosi 2mM, Dx 1 µM e Indo 60 µM] (azul). Datos obtenidos con tecnología n-Counter (Nanostring).

4.5.6 Ensayos funcionales del uso de sueros de pacientes con HOP y controles durante la diferenciación celular

El suero sanguíneo es la mayor representación del estado fisiológico del organismo ya que contiene los productos metabólicos celulares y es la muestra primaria para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades. Sabiendo esto, evaluamos el efecto de los sueros de las pacientes con HOP con diferente progresión de la enfermedad (SuerOP₁ y SuerOP₂) y de controles (SuerCtrl) en un modelo celular de diferenciación osteoblástica (línea celular SaOS-2) mediante la cuantificación en la expresión de marcadores osteogénicos y de rutas de señalización conservadas en la enfermedad.

Se obtuvieron cuantificaciones apropiadas para 16 de los 20 transcritos incluidos en el estudio. El cambio en los niveles de expresión se consideró relevante con un $\log_2FC > |1|$, los transcritos que no superaron este umbral se describen en el *ANEXO 17*.

Los cambios en los niveles de expresión de los marcadores se observaron en etapas tardías (día 14 y 21) de la diferenciación osteogénica en el modelo celular SaOS-2.

Al día 14 de la diferenciación se observó un descenso en los niveles de expresión de los marcadores: i) *PLIN2* con un $\text{Log}_2FC = -1,07$ en SaOS-2 con SuerOP₂ comparada con las enriquecidas con SuerCtrl (Figura 86a) y ii) *DKK1* con un $\text{Log}_2FC = -1,01$ en SaOS-2 con SuerOP₁ comparada con las enriquecidas con SuerOP₂ (Figura 86b).

Durante la maduración osteoblástica (día21), se observó un aumento en los niveles de expresión de los marcadores: i) *TNFSF11* o *RANKL* con un $\text{Log}_2FC = 1,03$ (Figura 86c); *PLIN2* con un $\text{Log}_2FC = 1,39$ en células enriquecidas con SuerOP₁ con respecto a las enriquecidas con SuerOP₂ y con un $\text{Log}_2FC = 1,14$ con respecto a las enriquecidas con SuerCtrl (Figura 86a). En la misma etapa de diferenciación se observaron niveles disminuidos de expresión del marcador *SOST* con un $\text{Log}_2FC = -1,38$ en células enriquecidas con SuerOP₁ comparada con el SuerOP₂ (Figura 86d).

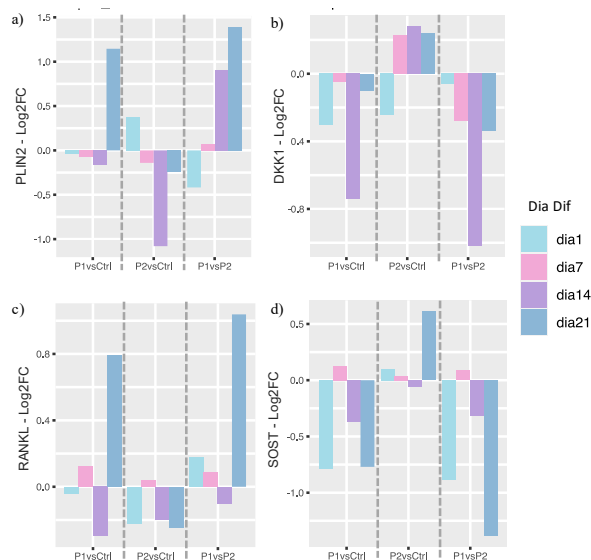


Figura 86. Análisis de expresión de marcadores osteogénicos. Cambios de expresión de los marcadores: a) Perilipin2 (*PLIN2*); b) Inhibidor 1 de la vía de señalización de Dickkopf, Wnt (*DKK1*); c) ligando de receptor activador para el factor nuclear κ L (*RANKL*); y, d) Esclerostina (*SOST*) entre osteoblastos SaOS-2 tratados con suero de las pacientes con HOP y el suero de controles. Expresión cuantificada con el uso de la tecnología n-Counter.

Del mismo modo, se determinó la actividad de formación yósea calculando la ratio entre la expresión de *OPG* y *RANKL*, e identificamos un incremento de 11 y 10 veces el valor de *OPG* con respecto a *RANKL* al día 14 de la diferenciación con el suero de la Paciente1 y 2 respectivamente. Por otro lado, la diferenciación con el suero de la Paciente1 mostró un incremento constante de la expresión de *OPG* con respecto al *RANKL* hasta el día 14. Durante la etapa de maduración osteogénica (día 21), *OPG* se disminuyó su expresión 2,8 veces con respecto al *RANKL* (*Figura 87*).

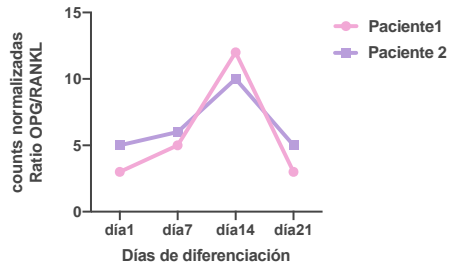


Figura 87. Representación de la relación entre marcadores OPG y RANKL en la diferenciación de osteoblastos SaOS-2 tratados con suero de las pacientes con HOP

5. DISCUSIÓN

En este trabajo presentamos la evolución clínica dramáticamente discordante del único caso de gemelas idénticas diagnosticadas con HOP portadoras de la misma mutación en el gen *GNAS* [361]. Se han descrito progresiones dispares de la enfermedad entre miembros de la misma familia [362,363], pero nunca, el caso de gemelas monocoriónicas genéticamente idénticas. En este caso, la Paciente1 presenta un fenotipo extremo severo, mientras que la Paciente2 permanece casi asintomática, y aunque se conoce el patrón de mutación específico en *GNAS* para el desarrollo de HOP y la forma en la que se presentan las lesiones osificantes, hasta ahora no es posible predecir la progresión de la enfermedad.

HOP es una entidad compleja, ya que guarda similitud con otras enfermedades osificantes con mutaciones en *GNAS* como son OC, AHO y PPHP, con las que, además, puede superponerse. El criterio diagnóstico diferencial de HOP frente al resto de los síndromes osificantes, es que la progresión de las osificaciones se desarrolla desde tejido superficial al profundo; a nivel histológico se caracterizan por ser predominantemente de tipo intramembranas [69,220,221,363–365] pudiéndose observar en algunos casos islas de osificaciones endocondrales [55,350,366,367]. Estas características se observaron en la Paciente1, quien muestra aparentemente osificaciones de tipo “mixto” dependiendo de su localización. De hecho, en biopsia de piel, el reporte anatomopatológico determina osificaciones intramembranas; mientras que los análisis de expresión génica realizado en piel de dos zonas distintas revelaron rutas biológicas activas de osificación endocondral (GO:0001958; GO:0002062). Esto sugiere que el microambiente alrededor de la zona donde se desarrolla la osificación puede influenciar la plasticidad celular, el *commitment* o destino celular y la diferenciación de las MSCs, procesos además condicionados en la HOP por la mutación en el gen *GNAS* [130,368–370].

La osteoinmunidad en el contexto de las enfermedades osificantes juega un papel determinante, ya que la unión de citoquinas y factores de crecimiento a las células osteoblásticas, dan lugar al circuito autocrino y paracrino involucrado en la remodelación ósea [371]. Una desregulación de las citoquinas MCP-1, MIP-1, RANTES y PDGF-AA observadas en las pacientes con HOP con respecto al control, pueden condicionar un desequilibrio entre la formación y reabsorción ósea. Los niveles reducidos que encontramos de las citoquinas MCP-1 y RANTES en la Paciente1 con respecto a los controles sanos, sugieren un déficit en la formación y diferenciación osteoclástica, dado que MCP-1 participa en la diferenciación, fusión y supervivencia de los osteoclastos [372], y es capaz de revertir la actividad supresora de GM-CSF en la formación de osteoclastos. En contraste, RANTES es capaz de recuperar la formación de células multinucleadas, pero sin la capacidad de reabsorber hueso, siendo además un potente promotor de la formación de osteoclastos [373]. Elevados niveles de calcio estimulan la secreción de RANTES por los osteoclastos lo que a su vez induce quimiotaxis de los osteoblastos, sugiriendo así tener una actividad autocrina/paracrina [374,375]. La citoquina PDGF-AA promueve la proliferación y migración de las MSCs, así como su diferenciación a osteoblastos mediante la activación de la vía BMP-Smad [376,377], ejerciendo una sobre-regulación en los niveles de expresión de *Runx2*, *Osterix* y *Atf4*, principales reguladores transcripcionales de la osteoblastogénesis, sin afectar su diferenciación a condrocitos y adipocitos [378,379]. El aumento de la PDGF-AA observado en las gemelas con HOP demuestra la participación de esta citoquina en el *commitment* celular de las MSCs hacia su diferenciación osteogénica. Otra citoquina de tipo proinflamatorio con efectos en la reabsorción ósea es la MIP-1 beta, la cual además actúa como inhibidor de la función osteoblástica, alterando la mineralización de la matriz ósea y suprimiendo la osteocalcina; además de infra-regular al factor de transcripción osteogénico *Osterix*, inhibiendo la formación de hueso.

Entre las gemelas observamos diferencias en los niveles séricos de estas citoquinas. Mientras que la Paciente1 presenta un desequilibrio en los factores que participan en la regulación de la homeostasis ósea, la Paciente2 a pesar de tener niveles aumentados del inmunoregulador estimulante de la osteoblastogénesis (PDGF-AA), presenta niveles normales de las citoquinas reguladoras de osteoclastogénesis (MCP-1 y RANTES. Estos hallazgos sugieren que la Paciente2 tiene una reabsorción ósea correcta que puede mantener controlada la osteoblastogénesis.

Observamos niveles dispares de otros marcadores séricos involucrados en el metabolismo y homeostasis ósea entre las gemelas. Las proteínas de matriz ósea (OPN y OC) reflejan la actividad osteoblástica, ya que son producidas por osteoblastos maduros durante la osteogénesis y la mineralización ósea [380]. La OPN actúa como regulador local osteoblástico e induce la migración, diferenciación y activación de osteoclastos; se ha sugerido como predictor de enfermedades óseas [381–383]. Por su parte la OC se ha descrito como el mejor marcador de maduración osteogénica; promotor de la biomineralización [384]; un regulador positivo de otros marcadores osteogénicos como RUNX2, ALPL, osteonectina y COL1; y regulador negativo de *Osterix* [385]. Por otro lado, la secreción de OC puede tener una función como hormona análoga a leptina o adiponectina [386]. Otras citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-6 en presencia de RANKL, aumentan la osteoclastogénesis dirigida por la ruta NF- κ B promoviendo la reabsorción ósea [387]. TNF- α suprime la expresión de activadores de la osteoblastogénesis (IGF-1, *osterix* y RUNX2)[388] e induce la producción de DKK1 y esclerostina (SOST), dos potentes inhibidores de la ruta Wnt, la cual controla la diferenciación osteoblástica y osteoclástica [389,390]. La leptina es una adipoquina que induce la adipogénesis y activa citoquinas proinflamatorias como la TNF- α y la IL-6, asociada con una reducción en la densidad ósea mineralizada, que participa en la reabsorción ósea e inhibición de la proliferación osteoblástica mediante receptores adrenérgicos en los osteoblastos [391,392].

La medición de estos marcadores en las gemelas nos permite evaluar de manera indirecta el metabolismo óseo y adipogénico condicionado por la mutación en *GNAS*. Observamos un perfil sérico que refleja un incremento en la producción osteoblástica con la elevación en la expresión de osteocalcina y una reabsorción ósea limitada por los niveles bajos de TNF- α en la Paciente1. Mientras que en la Paciente2 parece haber una compensación de los fenómenos osteoblásticos por el aumento en los niveles de moléculas con actividad osteoclástica (IL6) y de inhibición osteoblástica por promoción adipogénica (leptina). Además, la Paciente2 muestra una actividad de maduración osteoblástica inferior a la de la Paciente1.

*Al tratarse de una enfermedad ultra-rara, las opciones de tratamiento para HOP son limitadas, por lo que, durante el curso clínico de la Paciente1, fue necesario desarrollar un protocolo terapéutico, debido a la rápida progresión de la enfermedad. Ésta misma condición ha impedido hasta el momento, determinar una correlación entre el tipo de mutación, el curso clínico o los hallazgos analíticos con la progresión de la enfermedad. Sin embargo, la medición sérica de los BTMs permitió hacer un seguimiento de la enfermedad ya que los BTMs reflejan la actividad osteogénica. Fragmentos del colágeno tipo I, que es la proteína más abundante en el hueso, se utilizan para determinar la actividad catabólica y anabólica del hueso. CTX o β -*crosslaps* es un telopéptido que se libera del colágeno tipo I durante la reabsorción osteoclástica reflejando actividad de reabsorción ósea. Por otro lado, PINP es un marcador de secreción de colágeno por los osteoblastos y refleja la actividad anabólica del hueso [393–395]. En la

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monozygotic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

Paciente1 observamos un desequilibrio importante entre dichos marcadores, y aunque no fue posible correlacionarlos con la actividad de la enfermedad, fueron utilizados en el seguimiento de los tratamientos.

*La primera línea de tratamiento consistió en la administración de rhIGF-1 por su papel como regulador en el metabolismo óseo [339,340,396] y también como potente regulador de osteoclastos y reabsorción ósea [340]. Como respuesta al tratamiento se detectó un aumento del 10% en los marcadores de osteoclastogénesis y del 30% en la osteoblastogénesis; un efecto similar a lo observado en otras patologías e incluso en pacientes sanos después de la administración de la hormona [397,398]. Por otro lado, los niveles bajos de la hormona IGF-1 observados en la Paciente1, parecen ser resultado de la alteración en las rutas biológicas conservadas en HOP y no una causa o pieza clave en la enfermedad. Es posible que la administración subcutánea de IGF-1 no tenga efecto sobre la formación ósea o que se requieran dosis muy altas para observar una respuesta, además del hecho de que esta hormona actúa con mayor eficacia en la etapa de maduración ósea [398]. Los niveles bajos de IGF-1 también pueden deberse a una alteración de la secreción de la hormona de crecimiento (GH), sin embargo, la Paciente1 mostró niveles normales para su edad, al igual que para la proteína de unión a IGF-1 (IGFBP-3) [399]. Aunque las mutaciones en *GNAS* en el alelo materno, derivan en una resistencia a la hormona GHRH y, por lo tanto, en niveles bajos de IGF-1, la mayoría de los casos de HOP, al igual que en el caso de las gemelas, está causada por la mutación inactivante de *GNAS* en el alelo paterno. Además, según el alelo alterado, se desarrollan fenotipos diferentes de la HOP, por ejemplo, un fenotipo delgado si la mutación está presente en el alelo paterno, y con obesidad cuando está en el alelo materno. Además, los niveles bajos de IGF-1 se observan en estados de desnutrición, lo que sugiere que la continuada formación ósea en la HOP podría tener un impacto sobre el gasto energético [399]. La Paciente1 no fue sometida a pruebas de estimulación de la GH, ya que no cumplía los criterios para su realización. El seguimiento clínico y analítico realizado por nuestro grupo médico sugirió la ausencia de hipopituitarismo concomitante en la Paciente1 [399].

*Después de la rhIGF-1, se administraron terapias previamente descritas como beneficiosas en enfermedades osificantes. El ácido retinoico se propuso por su potencial para incrementar la producción de la proteína *Gs-α* por procedente del alelo normal [342]. Se ha reportado el uso de un receptor selectivo del ácido retinoico como inhibición de la formación de hueso ectópico [343,344]; de hecho, se ha propuesto el uso de los antagonistas del receptor γ del ácido retinoico como tratamiento para la FOP, ya que inhiben la osificación de tipo endocondral [400], la cual podría estar presente hasta en el 50% de las lesiones en pacientes con HOP [55]. La administración de retinoides tópicos y sistémicos en la Paciente1 no consiguieron detener la progresión de la enfermedad, lo que podría explicarse por una presencia mayoritaria de lesiones de tipo intramembranosa.

*La siguiente línea de tratamiento fue el uso de bifosfonatos, capaces de bloquear la mineralización de la matriz ósea. A pesar de observar una disminución de los marcadores de remodelación ósea después de la administración intravenosa de pamidronato, la Paciente1 presentó la formación de nuevas lesiones y progresión de las osificaciones antiguas. La administración continuada de pamidronato está relacionada con la “congelación” del metabolismo óseo, disminuyendo la formación y reabsorción ósea [346], sin embargo, el tratamiento tiene muy baja efectividad contra la formación activa de osificaciones [348,394,401]. En la Paciente1 se observó que las osificaciones progresaban y la matriz ósea

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monozygotic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

no se veía afectada cuando el bifosfonato se suspendía. En FOP se ha descrito que el pamidronato mejora los síntomas hasta en tres cuartas partes de los pacientes, pero las pautas actuales de manejo de la enfermedad informan de una utilidad limitada a largo plazo, ya que los ciclos repetidos conducen a fracturas de hueso normal, además de no ofrecer protección frente a futuros brotes de osificación [402]. Debido a los efectos adversos que la Paciente1 presentó con la administración de pamidronato, no se continuó con la administración de dosis más altas que permitiera evaluar el efecto a dosis acumuladas.

*La ruta de señalización Hh es esencial en el proceso de osificación intramembranosa y endocondral [403]. En los tejidos blandos normales, la proteína Gs- α inhibe la señalización de Hh y restringe espacialmente la formación de hueso al esqueleto normal. La sobre-regulación de Hh en ambos tipos de osificación es necesaria para inducir OH [130]. Al mismo tiempo, la pérdida de inhibición de Gs- α en la señalización de Hh puede conducir al desarrollo de meduloblastoma [404]. El itraconazol es un antifúngico oral que actúa como potente supresor de la vía de Hh. La misma dosis utilizada para el tratamiento de micosis inhibe el crecimiento de meduloblastoma en modelos de ratón con aloinjertos [347]. Hasta donde sabemos, no existen informes previos del uso de itraconazol en OH [402], pero teniendo en cuenta que es un fármaco de uso frecuente en niños inmunosuprimidos se incluyó en nuestro protocolo terapéutico. Desafortunadamente, después de administrarlo durante cuatro meses la Paciente1 desarrolló dos nuevas placas de osificación y una clara progresión de las más antiguas, por lo que el tratamiento se suspendió.

*Los corticoides son inmunomoduladores con capacidad antiinflamatoria frecuentemente usados como primera línea de tratamiento de las primeras osificaciones en pacientes con FOP [402,405]. Reportando una mejoría de síntomas en el 55% de los pacientes. Sin embargo, los protocolos actuales desaconsejan el uso a largo plazo y restringen su uso a pacientes con osificaciones que imposibilitan el movimiento; que perjudican principalmente las articulaciones; en la prevención de osificación después de un trauma severo; o postquirúrgico. Se administraron altas dosis de metilprednisolona vía intravenosa durante 5 días, seguida de una disminución gradual de la dosis durante 6 meses a la Paciente1. Observamos disminución en los marcadores de formación ósea, sin embargo, no hubo modificaciones visibles en la formación de las osificaciones.

*Uno de los tratamientos bien establecidos en la prevención de OH postquirúrgicas es el uso de AINES, como la Indometacina, los cuales inhiben la producción de prostaglandinas evitando la diferenciación de las MSCs [349]. Sin embargo, no hay evidencia suficiente de la eficacia de este tratamiento para prevenir osificaciones en pacientes con FOP. En el caso de la Paciente1, tras recibir indometacina durante 14 meses presentó dos periodos latentes de la enfermedad y recurrencia de osificación debajo de la cicatriz de una incisión quirúrgica previa.

*Encontramos que los niveles de PINP se mantuvieron constantemente elevados excepto en los periodos posteriores a la administración de pamidronato y metilprednisolona. Observamos una disminución evidente de ambos parámetros después del tratamiento con bifosfonatos y, además, la disminución de PINP se acompañó con un aumento en la resorción ósea cuando se administraron ciclos de metilprednisolona. En ningún caso el cambio en los niveles de BTMs fue precedido por una recaída de la enfermedad. Cabe destacar que la IGF-1 permaneció baja durante dos años posteriores a la interrupción de su administración.

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monochorionic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseus Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

*La progresión de la enfermedad de la Paciente1 continuó, consecuencias como hipermetabolismo, anquilosis de la pierna izquierda y retracción de la derecha, resultaron en la desviación de la Paciente1 de los percentiles normales de talla y peso, además de continuar con la formación de OH activa, dolor y movilidad limitada.

El protocolo terapéutico continuó con la administración de Everolimus (análogo de rampamicina) ya que estudios recientes se usó como tratamiento profiláctico frente a la FOP, demostrando prevenir la formación de OH inducida por un trauma mediante el arresto de la diferenciación osteogénica [406–408]. Everolimus es un inmunosupresor que inhibe al complejo mTORC1 (ruta mTOR) implicado en la diferenciación de MSCs a osteoblastos y que se ha reportado que podría disminuir los síntomas de la HOP [406,409,410]. Una vez aplicado el tratamiento se realizó un seguimiento exhaustivo de los marcadores bioquímicos relacionados con el metabolismo y reabsorción ósea. La correlación negativa observada entre los BTMs (CTX y PINP) y los niveles de Everolimus en sangre de la Paciente1, se corresponde con resultados previos que describen la reducción en la reabsorción ósea por inhibición de la vía mTOR [411–413]. Por otro lado, se observó una correlación positiva entre Everolimus y la PTH (hormona paratiroidea), hormona asociada con la regulación ósea. La PTH se caracteriza por su comportamiento paradójico, promoviendo la reabsorción ósea para liberar calcio iónico a la sangre cuando se administra continuamente [414], y teniendo un fuerte efecto anabólico que causa formación de hueso cuando la administración es intermitente y a bajas dosis [415]. De hecho, hoy en día, se utiliza como único tratamiento contra la osteoporosis [416]. A pesar del efecto inhibitorio descrito del Everolimus sobre la formación de OH, se observó una correlación positiva de éste con los niveles de PTH séricos. Sin embargo, los niveles de calcio permanecieron sin cambios durante el tratamiento. Esta observación podría ser consistente con la mutación en *GNAS*, ya que la afectación de la *Gs-α* puede producir una señalización anormal de la PTH [417]. Se ha descrito que los pacientes con HOP tienen buen funcionamiento del receptor de la PTH [418], lo que también se observa en las gemelas.

La vía Wnt es una de las rutas de señalización implicadas en la actividad anabólica del hueso, y su sobre-activación se ha asociado al desarrollo de osteopetrosis [150,419]. Por lo que la inhibición de la ruta Wnt/ β -catenina se ha propuesto como un tratamiento potencial para la OH [130]. Por otro lado, se sabe que algunos efectos anabólicos de la PTH están regulados por la ruta Wnt [419]. Nosotros observamos una correlación negativa (pero no estadísticamente significativa) entre los niveles séricos de los inhibidores de Wnt, DKK-1 y SOST y el tratamiento con Everolimus [420–422].

Durante la administración de Everolimus a la Paciente1, se observó una correlación de los niveles de glucosa con las concentraciones séricas de Everolimus. mTOR es una quinasa que se encuentra conformada por dos complejos proteicos diferentes: mTORC1, implicada en la regulación de varios procesos celulares relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular, y mTORC2 que participa en la cascada de señalización de la insulina. Se ha visto que la rampamicina, otro inhibidor de la mTOR, se une al receptor FKBP12 para inhibir directamente a mTORC1 [423]. En segundo lugar, la exposición crónica a la rampamicina inhibe el ensamblaje de mTORC2, lo que puede asociarse a complicaciones metabólicas, incluida la intolerancia a la glucosa. También se describieron perfiles lipídicos anormales con la administración de inhibidores de mTORC1, ya que éste regula la síntesis de lípidos

* Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monochorionic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseus Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.662669/>

principalmente mediante el factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBF1) un mecanismo que aún no se comprende por completo [424].

En general la Paciente1 toleró adecuadamente el tratamiento con Everolimus, siendo éste el tratamiento con la administración más prolongada de todo nuestro protocolo terapéutico. Se observó un efecto moderado en los marcadores de recambio óseo, y un aumento no significativo de la osteocalcina que es el principal factor pro osteoblástico. Este hallazgo podría sugerir que el tejido óseo en la Paciente1 intenta compensar la actividad osteoblástica, sin embargo, el tratamiento no consiguió modificar el curso clínico de la enfermedad, por lo que finalmente se suspendió el tratamiento.

Como último recurso terapéutico se incluyó una terapia innovadora y no agresiva patentada por el grupo de patologías musculoesqueléticas de nuestro Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS), diseñada para la prevención de OH en tejidos blandos. Esta triterapia se basa en el uso combinado de una tiazolidinedona (rosiglitazona y/o pioglitazona), que es un antidiabético que activa al receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR- γ) que en el contexto óseo controla la diferenciación de células mesenquimales y hematopoyéticas [425], con corticoides (dexametasona) y/o antiinflamatorios preferiblemente no esteroideos AINES (indometacina), los cuales muestran efecto sinérgico en la prevención de la OH. Las mejoras con esta terapia se esperaban entre el día 14 y el 21 de tratamiento. La triterapia fue administrada a la Paciente1 tres días antes de someterse a una cirugía de extracción de una placa de osificación, continuando el tratamiento en modo de biterapia, con dexametasona y pioglitazona durante 55 días, tiempo en el cual no se observó mejoría en la progresión de la enfermedad, sino que se observó crecimiento de las placas antiguas y la formación de nuevas en la misma zona de exéreis, por lo que fue interrumpido. Considerando que es un tratamiento principalmente dirigido a osificaciones endocondrales, las cuales están presentes solo en una proporción de las lesiones en HOP; aunado a la suspensión de la triterapia y la adaptación a biterapia; no fue posible evaluar el efecto real en la Paciente1.

La cirugía fue una necesidad en el plan de tratamiento de la Paciente1, a pesar de que uno de los riesgos de la exéresis de OH en los pacientes con HOP es la reincidencia de las lesiones [2,220,348,426]. Bajo el consentimiento de los padres y por petición de la Paciente1, se han llevado a cabo procedimientos quirúrgicos para retirar las osificaciones cuando éstas le impidían mantener una buena calidad de vida, siendo hasta el momento, la única alternativa ante la dramática progresión de la enfermedad.

Sin tener estudios precedentes, éste trabajo recoge los primeros datos epigenéticos reportados en pacientes con HOP. Las gemelas mostraron tener un perfil de metilación diferencial significativo entre ellas y los controles (todas niñas) ponderando el análisis por edad. Observamos que las CpGs significativas con mayor diferencia en la metilación se encontraban en genes involucrados en el desarrollo del sistema músculo esquelético y en la respuesta inmunitaria adaptativa, procesos desregulados en la HOP [427]. Hemos observado que las regiones dentro de un mismo gen, que se caracterizan por la presencia de múltiples posiciones metiladas, mostraron patrones de metilación similares en las pacientes con HOP, lo que sugiere una posible remodelación epigenética de estos locus. La mayoría de estas posiciones presentaron niveles de metilación más bajos en las pacientes que en los controles, sugiriendo un aumento en la expresión de los genes asociados a estas posiciones.

Se identificaron tres posiciones diferencialmente metiladas en el gen *DUSP14* también conocido como *MKP6*, que es una fosfatasa involucrada en la ruta MAPK y que tiene importantes funciones en la regulación de procesos celulares como la proliferación y diferenciación celular, respuesta inflamatoria y apoptosis [428]. Se ha descrito que *DUSP14* modula negativamente la formación de osteoclastos mitigando el desarrollo de osteoporosis

[429]. Los bajos niveles de metilación de *DUSP14* que supondría un aumento de expresión, podrían sugerir una disminución de la reabsorción ósea en las pacientes con HOP frente a los controles. Se identificaron cinco posiciones en el gen *NFYA* (subunidad alfa del factor de transcripción nuclear γ) que es un potente regulador de la auto-renovación y diferenciación celular por la activación de la ruta Notch1 [430] y que además puede interactuar con otras rutas como la Wnt o BMP en células osteogénicas y regular así el desarrollo del tejido esquelético [431]. La hipometilación de *NFYA* en las pacientes con HOP podría reflejar una desregulación de la actividad osteogénica.

Localizamos también otras cinco posiciones hipometiladas en el gen *DIP2C* (Proteína 2 que interactúa con el disco homólogo C), uno de los genes patogénicos candidatos de la displasia esquelética, un grupo de trastornos hereditarios generalizados del desarrollo de huesos y cartílagos [432].

Por otro lado, el análisis del perfil de metilación específico realizado en *GNAS* mostró dos posiciones con patrón diferencial, ya que para el resto de las posiciones las pacientes con HOP mostraron un perfil similar. En este caso, la Paciente2 y los controles comparten el patrón de metilación y se logran diferenciar del perfil de la Paciente1 en estas dos posiciones; sin embargo, estos resultados no fueron significativos cuando realizamos el ajuste por test múltiple. Las posiciones descritas en *GNAS* se encuentran en una región del gen que cubre diferentes transcritos. Esto podría sugerir una relación entre la expresión de cada uno de ellos y el estado de metilación, que, además, se da en diferentes lugares, ya que no ocurre siempre en las regiones promotoras o en el sitio de inicio de la transcripción. De hecho, se ha observado como la metilación que ocurre en el cuerpo del gen, es directamente proporcional a un mayor nivel de expresión del mismo gen [433], al contrario de lo que sucede en las regiones promotoras, donde la metilación está relacionada con la inhibición o desregulación en la expresión del gen [434]. Es necesario considerar la naturaleza tan compleja del gen *GNAS* y su característica de *imprinting* lo que provoca que los transcritos resultantes se puedan expresar a partir del alelo materno, del paterno, o de ambos, según el grado de metilación que puedan tener, lo cual desemboca en cambios de expresión y producción proteica.

El análisis transcriptómico en sangre permite relacionar la expresión génica con eventos sistémicos y con la actividad celular, lo que amplía el entendimiento de las rutas y vías de señalización que se activan o inactivan durante procesos biológicos normales y patológicos [435]. El estudio exploratorio de expresión génica en sangre de las pacientes con HOP (y replicas *in silico*) reveló diferencias en la expresión génica entre las pacientes con HOP con efecto funcional, ya que la mayoría de los genes diferencialmente expresados son codificadores de proteínas. En la Paciente1 con HOP severa, observamos una aparente sobre-regulación de la ruta Eph/ephrin (genes *PI3*, *MMP9*, *TUBB1* y *MYL9*) que regula diversos procesos del desarrollo embrionario como la segmentación [436,437]. A partir de la segmentación se producen estructuras mesodérmicas (somitas), al mismo tiempo que se activan las rutas Wnt y Notch1, las cuales tienen un papel en la regulación del desarrollo del tejido esquelético en la embriogénesis [213,438,439]. Además, la regulación de la ruta Eph/ephrin puede modular otras rutas determinantes en la proliferación y diferenciación de las MSCs, las interacciones célula-célula, así como en la activación, migración, adhesión y proliferación de células inmunológicas [440-442]. Estos resultados podrían apuntar hacia la hipótesis de una carga de mutación diferencial en la capa mesodérmica entre las gemelas, lo que produciría diferencias en la regulación génica desde etapas tempranas del desarrollo y que podría resultar en el fenotipo discordante de la enfermedad.

Otras rutas posiblemente sobre-activadas en HOP con fenotipo severo son la diferenciación de megacariocitos y actividad plaquetaria (genes *PF4*, *GP9*, *TREML1* y *SPDYC*) favoreciendo

la función osteogénica de las células endoteliales [443] y la respuesta inmunitaria reflejando cierta desregulación osteoimmune [444,445]. Los genes aparentemente infra-expresados se han relacionado con procesos poco descritos en el contexto de HOP.

Del conjunto de transcritos analizado en los diferentes tejidos (osificación y piel) de la Paciente1 y de los controles, hallamos un patrón de expresión similar entre las muestras de osificación; a pesar de ser obtenidas de zonas distintas, pero con diferencias frente a los perfiles de expresión del hueso control. Esto podría sugerir que las lesiones analizadas siguen el mismo proceso de osificación, aparentemente endocondral ya que los genes mayormente expresados (*COMP*, *MMP7* y *PPARGCIA*) se relacionan íntimamente con el desarrollo y diferenciación de condrocitos. *COMP* se expresa en los condrocitos y su papel es crítico para la organización de la matriz ósea en el cartílago [446]. Se ha observado que mutaciones en *COMP* afectan el desarrollo postnatal del cartílago, además de estar implicado en la reducción de la mineralización de masa ósea y en el desarrollo de displasias esqueléticas [447,448]. El gen *MMP7* que codifica para una metaloproteinasa altamente expresada en los condrocitos por la activación de la vía Wnt/ β catenina, una de las principales rutas implicadas en la osificación endocondral [449,450]. Se ha demostrado el papel fundamental del gen *PPARGCIA* (*PGC-1 α*) en la regulación de la asignación del *commitment* de las MSCs estromales, ya que se ha observado que la pérdida de *PGC-1 α* produce un aumento de la adipogénesis y una disminución de la osteoblastogénesis reduciendo así la capacidad de formar hueso [451,452]. Por otro lado, la *PGC-1 α* es un factor importante en el mantenimiento del metabolismo de los condrocitos, ya que se ha observado que su inhibición reduce la respiración mitocondrial y el potencial de la membrana de los condrocitos, haciéndolos menos resistentes al estrés [453].

Observamos un aumento en la regulación de las rutas TGF- β y BMP en las osificaciones de la Paciente1 con respecto al hueso control, esto está en consonancia con la fuerte conexión descrita entre dichas rutas durante la diferenciación osteoblástica, ya que la inducción de TGF- β 1 mediada por BMP-2 produce un volumen óseo cinco veces mayor que el producido por BMP-2, mejorando así la formación de OH [150,454]. Otra de las rutas desreguladas en la Paciente1 es la ruta Wnt, la cual participa en la diferenciación de las MSCs a condrocitos y osteoblastos. Se sabe que niveles bajos de la ruta Wnt dependiente de β -catenina inducen la expresión de *SOX9* activando la diferenciación condrogénica, mientras que niveles aumentados de la ruta conducen a la hipertrofia de los condrocitos, que es un paso determinante en la osificación endocondral [455–458].

En las muestras de osificación de la Paciente1, observamos también un aumento en la regulación de rutas involucradas con: i) el *commitment* de MSCs a osteoblastos y adipocitos, asociada a la mutación heterocigota en *GNAS*, que promueve la diferenciación osteoblástica a partir de MSCs derivadas de tejido adiposo [114]; ii) el ciclo celular G1/S asociada a un aumento en la diferenciación celular [459] y iii) la proliferación y diferenciación de las células epiteliales, que participan en la formación directa e indirectamente de la OH [460]. La contribución directa de esta población celular se basa en la hipótesis de un proceso de transdiferenciación de las células epiteliales a mesenquimales, las cuales potencialmente podrían dar lugar a células de linaje osteogénico [460,461]. Por otro lado, se ha sugerido que las células epiteliales pueden secretar BMP y otros factores osteogénicos que indirectamente producirían células osteogénicas [460,462].

En cuanto al perfil de expresión de la piel obtenidas de dos zonas diferentes (glúteo y rodilla) de la Paciente1, observamos un patrón claramente diferente. Mientras la piel de glúteo presenta un perfil más parecido a la piel control; la de la rodilla, presenta un aumento en la expresión de genes asociados mayoritariamente a procesos condrogénicos y de

transdiferenciación de células epiteliales, un patrón de expresión similar al observado en una osificación.

El hecho de que pudiese suceder una transdiferenciación celular y de que además hay estudios que demuestran que un aumento en la expresión de factores de crecimiento y de transcripción puede activar rutas involucradas en la transformación de condrocitos a osteoblastos (TGF- β , Wnt, BMP, Hh), podría explicar los niveles aumentados en la expresión de genes relacionados con la proliferación y diferenciación condrocítica en los tejidos analizados de la Paciente1 y la acelerada formación de OH.

En cuanto al perfil de miARN en sangre de las pacientes, identificamos seis miARN diferencialmente expresados entre la Paciente1 y la Paciente2, de los cuales, cinco mostraron mayor expresión en la Paciente1. Estos miARNs sobre-expresados interactúan principalmente con genes que intervienen en procesos como el *commitment* y diferenciación celular, adipogénesis y en la ruta TGF- β . Corroborando los hallazgos celulares y moleculares en HOP que sugieren que la mutación en *GNAS* condiciona el desbalance en el destino celular de las MSCs a osteoblastos y adipocitos [114].

Conjuntamente hemos observado un patrón de expresión pro-condrogénico en los diferentes tejidos de la Paciente1 lo que sugiere el desarrollo “mixto” de osificaciones endocondrales y de tipo intramembranoso.

Los cambios de expresión génica involucrados en HOP conducen a un cambio en la composición de las moléculas funcionales (proteoma) de la célula, y en ese sentido, los análisis proteómicos nos han permitido determinar cambios y/o alteraciones funcionales asociados a la fisiopatología de la enfermedad. Además, las nuevas tecnologías proteómicas que se han utilizado en el presente proyecto posibilitan la identificación y cuantificación de proteínas y sus posibles cambios post-traduccionales, y todas estas moléculas pueden ser utilizadas como posibles biomarcadores específicos de las patologías que podrían ayudar a mejorar su diagnóstico y/o pronóstico. Este esfuerzo de caracterización del proteoma en el contexto de HOP abre también una vía importante hacia la identificación de posibles dianas terapéuticas [291,463]

En este trabajo reportamos el perfil proteómico diferencial observado en el suero de pacientes con HOP y pacientes control. Las proteínas identificadas (64 exclusivas de las pacientes HOP, 34 exclusiva de la Paciente1 y 22 de la Paciente2) están asociadas a procesos de activación y adhesión plaquetaria. Estos procesos fueron consistentes tanto en la comparación entre las gemelas con HOP y los controles, como en la comparación entre ellas. Estos procesos pueden contribuir a la formación de OH ya que las plaquetas son células que han demostrado participar en la reparación ósea, promoviendo la proliferación de fibroblastos, osteoblastos, células epiteliales y condrocitos [464,465], las cuales producen hormonas que son fuertes inductores de la diferenciación osteoblástica [466,467]. También se ha sugerido que TGF- β liberada durante la agregación plaquetaria puede promover la osteoclastogénesis [468]. Por otro lado, observamos una disminución en la expresión de proteínas asociadas al proceso de intercambio de gases en las pacientes con HOP comparadas con los controles. Esto podría ser el reflejo de una insuficiencia en la disponibilidad de O₂ (hipoxia), resultando en la activación del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1). Se sabe que la sobre-expresión de HIF-1 induce la formación de OH mediante la regulación de proteínas clave en la modulación de los procesos de osteogénesis, angiogénesis y reabsorción ósea [469–471]. Se ha observado además, que las lesiones tempranas de FOP son altamente hipóxicas, lo que supone la activación del factor HIF-1 α que incrementa la intensidad y duración de la ruta canónica de señalización de las proteínas morfológicas del hueso (BMPs) induciendo la formación episódica de osificación heterotópica endocondral [470]. A pesar de que estos hallazgos solo se han identificado en la

FOP y no en formas genéticas de OH, consideramos relevante sugerir la participación de esta ruta en el caso de las pacientes con HOP, siendo el único reporte registrado con estos datos.

Identificamos un aumento de proteínas del sistema complemento en la Paciente1, lo que sugiere un aumento en la actividad de esta ruta con respecto a su hermana. Estos datos coinciden con lo observado en los marcadores de osteoinmunidad descritos anteriormente. La activación del sistema complemento a nivel local o sistémico, afecta el desarrollo de células óseas, su homeostasis y comunicación ya que proteínas como la C3a y C5a son producidas por los osteoblastos, liberando citoquinas proinflamatorias como la IL-6 e IL8. Además, la producción de C5a activa factores osteoclastogénicos necesarios para el eficiente desarrollo de los osteoclastos [251,472,473].

En la Paciente2 se observó un incremento en la activación y agregación plaquetaria, sugiriendo una regulación osteoblástica y osteoclástica mediada por la actividad bimodal de las plaquetas en la homeostasis ósea y en la reparación de heridas [474]. Aun cuando la participación de las plaquetas en la formación y remodelación ósea es un tema controvertido, se ha sugerido que las plaquetas inducen proliferación osteoblástica de manera dosis-dependiente del incremento en la producción de osteocalcina y la disminución de OPG controlado a su vez por la ruta TGF- β , teniendo además potencial de activación de osteoclastos a través de prostaglandinas y dependiente de RANKL [475–477]. Así mismo, observamos otro parámetro de regulación osteoblástica/osteoclástica (ratio OPG/RANKL) constante en la Paciente2 y mostrando una ligera disminución en la etapa de maduración osteoblástica. Ese cambio podría representar que en esa etapa, la Paciente2 regula la formación osteoblástica permitiendo la activación de la reabsorción ósea [478,479].

Tanto a nivel transcriptómico como proteómico, observamos concordancia de componentes relacionados con la activación plaquetaria. Este mecanismo tiene una implicación importante en la osteogénesis; por un lado, las proteínas que secretan las plaquetas durante su activación, estimulan la osteoblastogénesis; y una vez activadas, las plaquetas inducen la osteoclastogénesis regulada por TGF- β , la cual tiene capacidad estimulante/inhibitoria de la diferenciación de osteoclastos mediada por la señalización de SMAD1 y SMAD3 [468,480,481]. Al haber identificado una asociación concordante en dos enfoques ómicos relacionados con HOP nos permiten sugerir que esta vía podría estar interviniendo en el desarrollo de la enfermedad.

Identificamos otras rutas desreguladas en las pacientes con HOP todas con impacto en el metabolismo y hemostasis del hueso y que además coinciden con lo observado en los demás estudios ómicos realizados en este trabajo. Por ejemplo, observamos un aumento en la respuesta inmunológica similar a lo observado en los marcadores de osteoinmunidad. Además, las proteínas identificadas como exclusivas de las pacientes con HOP están involucradas en las vías de señalización mTOR, TGF- β , Notch, Wnt, MAPK, Leptina y señalización por receptor de la proteína G (GPCR), todas éstas desreguladas en el perfil transcriptómico de tejidos (piel y osificación) que hemos presentado.

La proteína caveolin-3 (CAV3) se detectó exclusivamente en los controles, la cual ha demostrado que tiene capacidad regulatoria sobre la ruta de señalización Wnt en modelos animales [482]. La ausencia de esta proteína en las gemelas podría deberse a un fallo en el proceso de regulación del metabolismo óseo, lo que podría sugerir un posible papel en el desarrollo de la HOP. Por otro lado, distinguimos la presencia de la proteína filamina C en las gemelas con HOP y no en los controles. Hay diversos estudios que describen la participación de las filaminas (en especial de la FlmB) en la diferenciación condrocítica, ya que la pérdida de FlmB conlleva a la acumulación de fosfo-Smad3 que activa a RUNX2 promoviendo los condrocitos hipertróficos, que pueden generar osteoblastos y osteocitos [483,484]. Pese a no

tener datos de la actividad de la Filamina C en la osteogénesis, pero considerando que forma parte de una familia de proteínas con actividad condrogénica, su hallazgo podría sugerir un posible papel como intermediaria en el desarrollo de la OH.

Encontramos un efecto funcional de los sueros de ambas pacientes con HOP en células osteoblásticas durante el proceso de diferenciación osteogénica. Los componentes séricos de la Paciente2 impactaron negativamente la diferenciación osteogénica, observamos disminuida la expresión de los marcadores RANKL el cual promueve la osteoclastogénesis y regula negativamente la osteoblastogénesis [485]; y, de PLIN2, que es una proteína altamente expresada al inicio de la diferenciación osteogénica por células osteo-progenitoras y al final del proceso por los osteoblastos maduros [486]. Por otro lado, los marcadores DKK1 y SOST se hallaron aumentados en la Paciente2, ambos implicados directamente con la inhibición de la ruta Wnt, β -catenina, ruta controlada por la Gs- α y que regula la formación de osificación intramembranosa [369,487–489]. Estos hallazgos nos hacen considerar que, a pesar de que la Paciente2 es portadora de una mutación patogénica en *GNAS* con potencial para exacerbar las rutas implicadas en la formación ósea, lo cierto es que esta paciente parece estar regulando o compensando el efecto de la enfermedad gracias a una actividad osteoclástica normal.

Uno de los logros de este trabajo fue el establecimiento de cultivos primarios a partir de piel, osificación y grasa de la Paciente1; además de obtener los cultivos primarios de tejidos controles sanos de hueso y piel. Estos tejidos son los que se encuentran directamente implicados en la HOP, por lo que estos cultivos nos permitieron observar algunas características celulares de la enfermedad. Las células obtenidas, osteoblastos “like”, fibroblastos y pre-adipocitos, mostraron características de células provenientes de MSCs, como es la capacidad de adherencia a la superficie de cultivo, la cual está mediada por las proyecciones del citoplasma/citoesqueleto correspondiente a filopodio y lamelipodio que dan la morfología alargada a este grupo de células y permiten su migración y comunicación célula-célula [490]. Se observó capacidad proliferativa para todos los cultivos primarios, sin embargo mantuvimos controlados los subcultivos ya que son células finitas que pueden sobrevivir, dependiendo el tipo celular, 40-50 divisiones antes de morir [491].

Parte de la complejidad que supone el estudio de la HOP como enfermedad ultra rara, es su etiología, ya que implica una mutación inactivante en el gen *GNAS*, uno de los más complejos del humano, que codifica múltiples tránsitos e isoformas. Además, su expresión está regulada por el *imprinting* genético, que es tejido-específico [54,91]. Debido al *splicing* alternativo que sufre su pre-mARN, Gs- α tiene una variante corta (Gs α -s) y una larga (Gs α -L) las cuales se expresan en todos los tejidos bialélicamente y son detectados por *western-blot* con dos bandas de 45 y 52 kDa respectivamente. Funcionalmente son muy similares y sus pequeñas diferencias no han demostrado un efecto biológico. Hemos identificado dos bandas de la proteína Gs- α en todos los cultivos primarios portadores de la mutación en *GNAS* y de controles, mediante el uso de un anticuerpo de unión específica a la proteína completa. Los pesos moleculares apuntan a que las bandas identificadas corresponden a las variantes Gs α -s y Gs α -L, expresadas bialélicamente, determinando que la mutación afecta un alelo mientras el otro permanece estable. Coincidiendo con lo reportado en la base de datos *Protein Atlas*, observamos la mayor expresión de ambas variantes en los fibroblastos con respecto a los osteoblastos y pre-adipocitos. También hemos detectado la localización citoplasmática de las variantes de Gs- α en todos nuestros cultivos primarios y su colocalización con la α -tubulina, que mantiene una alta afinidad de unión para modular la dinámica de los microtúbulos teniendo un impacto en la forma y crecimiento celular [492]. A pesar de observar pequeñas diferencias en la expresión de las isoformas entre las células control, las obtenidas de tejido sano de la Paciente1 y las adyacentes a la osificación; no fue posible realizar un análisis estadístico debido a la condición

finita de las células que impidió las réplicas experimentales. Además, hoy en día no existen referencias bibliográficas con las cuales comparar nuestros hallazgos, siendo este el primer reporte que identifica y localiza las variantes Gs α -s y Gs α -L en células obtenidas de diferentes tejidos de una paciente con HOP.

Una de las funciones del gen *GNAS* es la regulación de la diferenciación adipogénica, por lo que la mutación inactivante en el alelo paterno, propia de la HOP, resulta en una diferenciación errónea de los precursores multipotentes adipocíticos de la capa dérmica de la piel hacia un linaje osteogénico, formando la OH [493][494]. Demostramos la capacidad de diferenciación en los osteoblastos “like” observando una tendencia similar en la expresión de los marcadores de cada etapa de la diferenciación osteogénica entre los osteoblastos de osificación (Ob_{osif}) y los de hueso control (Ob_{ctrl}), que está en consonancia con lo reportado en la literatura [495].

El aumento del marcador adipogénico FBP4 en los osteoblastos “like” de osificación nos sugiere que esas células podrían ser precursores adipogénicos que se han redireccionado a osteoblastos. En un contexto de transdiferenciación de adipocitos a osteoblastos podemos proponer dos hipótesis principales: i) la inactivación genética de Gs- α como sucede en la HOP, sobre-regula la β -catenina quien actúa como molécula transactivadora de células precursoras adipogénicas/osteogénicas, y activa a su vez señalizaciones que regulan la maduración osteoblástica [496,497]; ii) se ha observado que en medio osteoblástico, el aumento en la expresión de RUNX2, como observamos en los Ob_{osif}, desdiferenciaría a los adipocitos subcutáneos promoviendo a su vez la osteoblastogénesis [498–500].

Uno de los retos que se plantean en el estudio de la HOP es identificar posibles dianas terapéuticas que puedan ayudar a paliar los efectos de la enfermedad, sobre todo en aquellos pacientes con un fenotipo severo de la enfermedad. En ese sentido y gracias al desarrollo de ols cultivivos primarios que hemos obtenido a partir de osificaciones de la Paciente1, evaluamos el potencial terapéutico de moléculas dirigidas a las vías desreguladas en la HOP durante la diferenciación osteogénica.

Todos los tratamientos mostraron tener efecto negativo en la expresión de los marcadores de diferenciación osteogénica en los osteoblastos aislados de la osificación. Observamos mayor efecto con la adición de Everolimus, Vismodegib y la Triterapia. No logramos ver una inhibición de la ruta Wnt con las dosis probadas de Esclerostina, lo que podría indicar un efecto muy débil o nulo sobre la diferenciación osteogénica en células primarias de osificación.

El Everolimus ha demostrado mitigar la formación de OH en etapas tempranas, mediante la inhibición de mTOR y la disminución del factor de hipoxia (HI-1 α), que es indispensable en la proliferación y diferenciación de condrocitos durante la osificación endocondral [266,501]. A pesar de observar una eficacia *in vitro*, en la Paciente1 la administración de Everolimus no disminuyó la formación de OH. Siendo que las evidencias en la eficacia de este tratamiento se enfocan en enfermedades osificantes por traumatismo que generan lesiones endocondrales, y sabiendo que en la HOP al menos la mitad de las lesiones son de tipo intramembranosa, pudiéramos considerarla una explicación plausible del poco efecto de la terapia. Otro punto para considerar es que los modelos celulares son sistemas controlados en los que no se puede mimetizar las interacciones que existen en los tejidos *in vivo*.

El Vismodegib es un inhibidor selectivo de la ruta Hedgehog (Hh) aprobado por la FDA como tratamiento para el carcinoma basocelular y que demostró tener un gran impacto en la homeostasis del hueso, afectando la diferenciación osteoblástica e induciendo fracturas óseas no traumáticas [502]. Esta ruta es modulada negativamente por Gs- α , por lo que su inactivación, como sucede en la HOP, es suficiente para desarrollar OH de tipo intramembranosa [130]. Observamos disminuida la capacidad de diferenciación en los cultivos primarios osteoblásticos

tratados con Vismodegib por la infra-expresión de la mayoría de los marcadores analizados. A pesar de parecer una opción plausible como una posible terapia frente a HOP, no se ha demostrado su seguridad en menores de 18 años.

También observamos inhibición de la diferenciación osteogénica en los cultivos primarios de osificación después de ser tratados con la Triterapia (Rosiglitazona, Dexametasona e Indometacina). La tiazolidinediona (Rosi) es un agonista del receptor PPAR- γ y promueve la diferenciación adipogénica de las MSCs sobre la osteoblastogénesis, resultando en una pérdida de masa ósea [503–508]. Los corticosteroides como la dexametasona, han demostrado tener un impacto sobre la homeostasis ósea, induciendo la reabsorción ósea y al mismo tiempo disminuyendo su formación, sugiriendo que su uso a largo plazo puede inducir osteoporosis [509]. Además los corticoides inducen la producción de la proteína Gs- α que modula la formación ósea vía Hh [510,511]. Por su parte, los AINES promueven la adipogénesis incrementando los niveles de PPAR γ , además es un tratamiento comúnmente usado en el remodelado óseo y reparación de tejidos [512,513].

La combinación de estas tres terapias tiene un efecto sinérgico que promueve la acumulación intracelular de gotas de lípidos, lo que supone una infra regulación de marcadores óseos indicando una diferenciación adipogénica [514]. Son tratamientos seguros que pueden ser administrados a la población pediátrica. En nuestro caso la Paciente1 no respondió al tratamiento, probablemente porque se requiera un esquema de tratamiento más prolongado.

A pesar de la existencia de otros casos familiares de HOP con mutaciones específicas de *novo* en el gen *GNAS*, éstos solo se han descrito en un solo miembro familiar, siendo nuestro caso, el único caso de HOP en gemelas. La mutación que presentan las gemelas se ha determinado como una mutación *hot spot* para otros síndromes del espectro osificante como el AHO/ PHP1a, aunque en ninguna de ellas se presentan características fenotípicas que sugieran una superposición de síndromes [55]. Se ha propuesto la hipótesis de que la HOP podría ser un trastorno con mosaicismo segmental de tipo 2, lo que sugiere una pérdida de heterocigocidad de la mutación inactivante en *GNAS* durante estadios tempranos del desarrollo embrionario, sin embargo esto contradice las observaciones clínicas y genéticas que indican que la mutación del gen se encuentra en el alelo paterno [82]. Otra de las vías exploratorias a tener en cuenta en la HOP sería considerar una segunda mutación en otro un gen que tenga una similitud con *GNAS* o con las rutas de señalización que regula[515].

El estudio de las enfermedades raras y ultra-raras es un gran reto debido a diversas limitaciones. Este trabajo se llevó a cabo con un número limitado de muestras de las pacientes con HOP y de controles, sobre todo en lo que respecta a los tejidos de hueso y piel.

En el caso de la Paciente1 las muestras obtenidas para investigación estaban condicionadas por los seguimientos clínicos y las respectivas cirugías a las que se sometió la paciente. En las primeras muestras obtenidas, el material resultaba escaso para los tipos de análisis que se pretendían realizar. Es importante resaltar que la paciente estuvo periódicamente sometida a tratamiento farmacológico, lo que podría interferir con algunos de los análisis propuestos para la caracterización del comportamiento de HOP en un fenotipo extremo, por lo que la extracción de muestra sanguínea se limitó a los periodos libres de fármacos, y en los que coincidiera con la necesidad clínica de realizar una venopunción para su seguimiento clínico.

El acceso a muestras sanguíneas de la Paciente2 fue aún más restringido, debido a la edad y a su escasa sintomatología, no era necesario realizar analíticas de control clínico.

Hemos observado que HOP es una enfermedad tejido-específica. Una limitante a la hora de evaluar la enfermedad a nivel tisular fue la ausencia de muestra de la Paciente2 asintomática con la que hacer las comparaciones adecuadas con su hermana afecta. No fue posible realizar

estudios comparativos en tejidos con muestras de la Paciente2, ya que no existía indicación clínica para realizar ningún procedimiento invasivo.

La información sobre HOP es relativamente escasa, además de haberse descrito casos en hermanos, éste es el único caso existente de gemelas idénticas con la enfermedad con mutación de *novo* y que tienen una progresión discordante. De tal forma que los hallazgos encontrados tuvieron que interpretarse con respecto a la información existente de enfermedades que pertenecen al espectro de patologías que producen osificación heterotópica y a lo reportado en los pocos casos de HOP que existen actualmente.

Otro de los retos desafiantes con los que nos encontramos, fue la obtención de muestras de controles sanos. Buscamos en todo momento, la inclusión de muestras control de pacientes de la misma edad y sexo que las gemelas, lo cual no fue siempre posible. El acceso a tejido sano de pacientes pediátricos se limita a intervenciones quirúrgicas programadas en las que no es necesario realizar un estudio anatomopatológico de los tejidos resecados. La poca cantidad de tejido obtenido imposibilitó su uso para todos los análisis descritos en este trabajo y tampoco permitió realizar las réplicas necesarias para poder llevar a cabo métodos de comparación estadística. El análisis estadístico se limitó a ser descriptivo en varios de los estudios por la imposibilidad de realizar un análisis comparativo, ya que, en ocasiones, únicamente contamos con los datos de una paciente frente a la otra.

Los cultivos primarios obtenidos de los tejidos de la Paciente1 son finitos, y para preservar el fenotipo intacto es importante mantener el subcultivo controlado, lo que a su vez acortó su uso en experimentos y el número de réplicas.

A pesar de las importantes limitantes del trabajo, hemos conseguido realizar un estudio integrativo molecular y celular nunca antes descrito en pacientes con HOP que nos ha permitido aportar información característica del fenotipo más extremo de la HOP y sugerir hipótesis en relación al desarrollo de la enfermedad. Los resultados de nuestro trabajo servirán como base para el estudio de la HOP en el futuro, abriendo nuevas vías de investigación en esta enfermedad y arrojando luz sobre los mecanismos moleculares que están actuando bajo el fenotipo de esta enfermedad ultra-rara tan poco conocida.

6. CONCLUSIONES

GENERAL

Hemos realizado un estudio integral ómico que nos permite describir, por primera vez y desde diferentes enfoques, las características de la Heteroplasia Ósea Progresiva en gemelas idénticas cuya progresión evolucionó como fenotipos extremos de la enfermedad. Nuestros hallazgos destacan posibles mecanismos relacionados con el comportamiento molecular y funcional de la enfermedad, así como algunos relacionados con la diferencia en la progresión. Construyendo nuevas perspectivas para el estudio de la Heteroplasia Ósea Progresiva.

ESPECÍFICAS

PRIMERA

Describimos el caso único en el mundo de Heteroplasia Ósea Progresiva en gemelas genéticamente idénticas que, a pesar de compartir la misma mutación germinal inactivante en el gen *GNAS*, presentan un curso clínico discordante. Lo que nos permite sugerir que la mutación *per se* no es un factor determinante en la evolución clínica de la enfermedad.

SEGUNDA

Establecimos un protocolo de tratamientos compasivos administrados a la Paciente1. Ninguna de las terapias propuestas logró mitigar los síntomas y/o progresión de la enfermedad. El tratamiento quirúrgico ha sido, hasta el momento, la mejor opción para aliviar las molestias y mejorar su calidad de vida.

TERCERA

Determinamos la implicación de los factores osteoinmunes sobre la actividad osteogénica en las pacientes con Heteroplasia Ósea Progresiva. La Paciente1 presenta un incremento en factores asociados con actividad osteoblástica e inhibición de los relacionados con la reabsorción ósea. Por otro lado, la Paciente2 presentó un patrón que refleja una correcta reabsorción ósea.

CUARTA

Realizamos el primer análisis epigenético reportado en pacientes con Heteroplasia Ósea Progresiva. Reconocimos un perfil de hipometilación en genes asociados con la absorción ósea en las gemelas con respecto a los controles. Encontramos un patrón epigenético diferencial entre las pacientes con Heteroplasia Ósea Progresiva en el gen *GNAS*, y que implica a dos posiciones diferencialmente metiladas en la Paciente1 cuando se compara con el perfil de su hermana y con controles sanos.

QUINTA

Identificamos diferencias en la expresión génica a nivel sistémico, realizando el primer análisis transcriptómico reportado en gemelas con Heteroplasia Ósea Progresiva. La Paciente1 presentó un aumento en los niveles de expresión de genes que intervienen con el desarrollo esquelético durante la embriogénesis, lo que sugiere que una desregulación en la diferenciación celular provoca la formación de las osificaciones heterotópicas semejante al que ocurre en etapas tempranas del desarrollo.

Determinamos que, a nivel transcriptómico, existen diferencias en el tipo de osificación dependiendo de su localización. La osificación subdérmica presenta un perfil de expresión que

la podría definir como intramembranosa, mientras que la osificación de tejido profundo tiene un patrón endocondral.

Evidenciamos la sobre-activación de las rutas de señalización implicadas en la formación de osificación heterotópica, correspondiente a la Heteroplasia Ósea Progresiva.

Describimos miARNs diferencialmente expresados que intervienen en la diferenciación de células madre mesenquimales a células óseas; los cuales podrían actuar como factores regulatorios.

SEXTA

Analizamos el perfil proteómico en suero de las pacientes con Heteroplasia Ósea Progresiva, que al igual que lo observado en los perfiles transcriptómicos, identificamos en la Paciente1 proteínas que promueven la osteoblastogénesis, la cual se encuentra regulada en la Paciente2 con la presencia de proteínas que provocan la activación osteoclástica.

Demostramos la implicación de la actividad plaquetaria como modulador sistémico de la homeostasis ósea y que tiene efecto en la formación de las osificaciones heterotópicas.

Demostramos la presencia exclusiva de la proteína Filamina-C con actividad condrogénica; y la ausencia exclusiva de la proteína caveolin-3 (CAV3) implicada en la regulación de la osteoblastogénesis; en las pacientes con Heteroplasia Ósea Progresiva frente a los pacientes controles.

SÉPTIMA

Establecimos cultivos primarios de los tejidos implicados en la Heteroplasia Ósea Progresiva obtenidos de la Paciente 1 y tejidos de pacientes sin Heteroplasia Ósea Progresiva. Verificamos la presencia y localización de la proteína Gs- α y una de sus isoformas, en los distintos cultivos. Demostramos que estas células conservan su capacidad de diferenciación, lo que nos permitió observar la expresión de componentes adipogénicos al inicio de la diferenciación osteoblástica, evidenciando que las osificaciones de la Paciente1 podrían tener un origen pre-adipogénico.

En los cultivos primarios observamos que tanto el Everolimus, Vismodegib, Esclerostina y triterapia (Rosiglitazona, Dexametasona e Indometacina) disminuyen la capacidad de diferenciación de las células osteoblásticas de la Paciente1.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] MedGen. Progressive osseous heteroplasia(POH) 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen/C0334041>.
- [2] Tresserra L, Tresserra F, Grases PJ, Badosa J, Tresserra M. Congenital plate-like osteoma cutis of the forehead: An atypical presentation form. *J Cranio-Maxillo-Facial Surg* 1998;26. doi:10.1016/S1010-5182(98)80048-6.
- [3] Aynaci O, Mütgan Aynaci F, Çobanoğlu O, Alpay K. Progressive osseous heteroplasia. A case report and review of the literature. *J Pediatr Orthop Part B* 2002;11:339–42. doi:10.1097/01202412-200210000-00013.
- [4] Edmonds HW, Coe HE, Tabrah FL. Bone formation in skin and muscle: A localized tissue malformation or heterotopia. *J Pediatr* 1948. doi:10.1016/S0022-3476(48)80276-3.
- [5] Kaplan FS, Shore EM, Wagman Rachael B, Roth Sandra, Gardne FB. WHAT IS POH? Progressive Osseus Heteroplasia. A guidebook for families. Second. 2007.
- [6] Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, Khan ZM, Tesoro T, Molsen E, et al. Rare Disease Terminology and Definitions-A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value Heal* 2015. doi:10.1016/j.jval.2015.05.008.
- [7] Regulation (EC) No 141/2000 of The European Parliament and of The Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products. 2000 2000. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02000R0141-20090807> (accessed January 2, 2020).
- [8] Lee S, Choi M. Ultra-rare Disease and Genomics-Driven Precision Medicine. *Genomics Inform* 2016. doi:10.5808/gi.2016.14.2.42.
- [9] Hennekam RCM. Care for patients with ultra-rare disorders. *Eur J Med Genet* 2011. doi:10.1016/j.ejmg.2010.12.001.
- [10] Bell SA, Tudur Smith C. A comparison of interventional clinical trials in rare versus non-rare diseases: an analysis of ClinicalTrials.gov. *Orphanet J Rare Dis* 2014. doi:10.1186/s13023-014-0170-0.
- [11] Rath A, Salamon V, Peixoto S, Hivert V, Laville M, Segrestin B, et al. A systematic literature review of evidence-based clinical practice for rare diseases: What are the perceived and real barriers for improving the evidence and how can they be overcome? *Trials* 2017. doi:10.1186/s13063-017-2287-7.
- [12] THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, ŠIMERKA Petr. COUNCIL RECOMMENDATION of 8 June 2009 on an action in the field of rare diseases. *Off J Eur Union* 2009.
- [13] Aymé S RC. European Committee Expert Group on Rare Diseases. Report on the State of the Art of Rare Disease Activities in Europe. 2014. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/rare_diseases/docs/2014report_rare_disease_activitiessu_1_en.pdf.
- [14] Van der Zeijden A, Huizer J. Recommendations for the development of national plans for rare diseases. *Orphanet J Rare Dis* 2010. doi:10.1186/1750-1172-5-s1-o3.
- [15] Garattini S, Jakobsen JC, Wetterslev J, Bertele V, Banzi R, Rath A, et al. Evidence-based clinical practice: overview of threats to the validity of evidence and how to minimise them. *Med Flum Med Flum* 2017. doi:10.21860/medflum2017_187362.
- [16] Garattini S, Jakobsen JC, Wetterslev J, Bertelè V, Banzi R, Rath A, et al. Evidence-based clinical practice: Overview of threats to the validity of evidence and how to minimise them. *Eur J Intern Med* 2016. doi:10.1016/j.ejim.2016.03.020.
- [17] Schlander M, Garattini S, Holm S, Kolominsky-Rabas P, Nord E, Persson U, et al. Incremental cost per quality-adjusted life year gained? The need for alternative methods to evaluate medical interventions for ultra-rare disorders. *J Comp Eff Res* 2014. doi:10.2217/cer.14.34.
- [18] Potter BK, Khangura SD, Tingley K, Chakraborty P, Little J. Translating rare-disease therapies into improved care for patients and families: What are the right outcomes, designs, and engagement approaches in health-systems research? *Genet Med* 2016. doi:10.1038/gim.2015.42.
- [19] Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ, et al. Power failure: Why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2013. doi:10.1038/nrn3475.
- [20] Djuricic S, Rath A, Gaber S, Garattini S, Bertele V, Ngwabyt SN, et al. Barriers to the conduct of randomised clinical trials within all disease areas. *Trials* 2017. doi:10.1186/s13063-017-2099-9.

- [21] Valdez R, Ouyang L, Bolen J. Public health and rare diseases: Oxymoron no more. *Prev Chronic Dis* 2016. doi:10.5888/pcd13.150491.
- [22] Veltman JA, Brunner HG. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 2012. doi:10.1038/nrg3241.
- [23] Rahbari R, Wuster A, Lindsay SJ, Hardwick RJ, Alexandrov LB, Al Turki S, et al. Timing, rates and spectra of human germline mutation. *Nat Genet* 2016. doi:10.1038/ng.3469.
- [24] Fitzgerald TW, Gerety SS, Jones WD, Van Kogelenberg M, King DA, McRae J, et al. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* 2015. doi:10.1038/nature14135.
- [25] Mencacci NE, Rubio-Agusti I, Zdebek A, Asmus F, Ludtmann MHR, Ryten M, et al. A Missense Mutation in KCTD17 Causes Autosomal Dominant Myoclonus-Dystonia. *Am J Hum Genet* 2015. doi:10.1016/j.ajhg.2015.04.008.
- [26] Zech M, Lam DD, Francescato L, Schormair B, Salminen A V., Jochim A, et al. Recessive Mutations in the $\alpha 3$ (VI) Collagen Gene COL6A3 Cause Early-Onset Isolated Dystonia. *Am J Hum Genet* 2015. doi:10.1016/j.ajhg.2015.04.010.
- [27] Lee S, Moon JS, Lee CR, Kim HE, Baek SM, Hwang S, et al. Abatacept alleviates severe autoimmune symptoms in a patient carrying a de novo variant in CTLA-4. *J Allergy Clin Immunol* 2016. doi:10.1016/j.jaci.2015.08.036.
- [28] Mousallem T, Urban TJ, McSweeney KM, Kleinstejn SE, Zhu M, Adeli M, et al. Clinical application of whole-genome sequencing in patients with primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2015. doi:10.1016/j.jaci.2015.02.040.
- [29] Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: Discovery to translation. *Nat Rev Genet* 2013. doi:10.1038/nrg3555.
- [30] (WHO) WHO. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD) 2021. <https://www.who.int/classifications/classification-of-diseases>.
- [31] World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems, 10th revision (ICD-10), Fifth version. World Heal Organ 2016.
- [32] Pato Alonso S, Navalón Cebrián R, Pastor Sanmillán MD, Asensio Villahoz P, Salido Campos C, Anso Borda I, et al. Manual de Codificación. CIE-10-ES Diagnósticos. Man Codif 2016.
- [33] (WHO) WHO. ICD-10 Version:2010 2018. <https://icd.who.int/browse10/2010/en#/M60-M79>.
- [34] Vanakker O, Callewaert B, Malfait F, Coucke P. The Genetics of Soft Connective Tissue Disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2015. doi:10.1146/annurev-genom-090314-050039.
- [35] Ács N, Bánhidly F, Czeizel AE. Diseases of the Musculoskeletal System and Connective Tissue. In: Ács N, Bánhidly FG, Czeizel AE, editors. *Congenit. Abnorm. Preterm Birth Relat. to Matern. Illnesses Dur. Pregnancy*, Dordrecht: Springer Netherlands; 2010, p. 335–40. doi:10.1007/978-90-481-8620-4_14.
- [36] Pearson AM, Young RB. Diseases and Disorders of Muscle. *Adv Food Nutr Res* 1993. doi:10.1016/S1043-4526(08)60119-9.
- [37] Orphanet 2021. <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=ES>.
- [38] T.W.Sadler. *Langman Embriología Médica:con orientación clínica*. 10º. 2008.
- [39] Pogue RE, Cavalcanti DP, Shanker S, Andrade R V., Aguiar LR, de Carvalho JL, et al. Rare genetic diseases: update on diagnosis, treatment and online resources. *Drug Discov Today* 2018. doi:10.1016/j.drudis.2017.11.002.
- [40] Lee CE, Singleton KS, Wallin M, Faundez V. Rare Genetic Diseases: Nature’s Experiments on Human Development. *IScience* 2020. doi:10.1016/j.isci.2020.101123.
- [41] Bauer JW, Schmuth M, Bodemer C. A focus on rare and undiagnosed skin diseases. *Exp Dermatol* 2019. doi:10.1111/exd.14035.
- [42] Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *Am J Med Genet Part A* 2019. doi:10.1002/ajmg.a.61366.
- [43] Rimoin DL, Pyeritz RE, Korf B. *Emery and Rimoin’s principles and practice of medical genetics*. 2013. doi:10.1136/jmg.34.7.614-a.
- [44] Krakow D, Rimoin DL. The skeletal dysplasias. *Genet Med* 2010. doi:10.1097/GIM.0b013e3181daae9b.
- [45] Michael Latrjet ARL. *Anatomía Humana*. 4a ed. 2006.

- [46] Vellodi A. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* 2005. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05293.x.
- [47] Minisola S, Peacock M, Fukumoto S, Cipriani C, Pepe J, Tella SH, et al. Tumour-induced osteomalacia. *Nat Rev Dis Prim* 2017. doi:10.1038/nrdp.2017.44.
- [48] Chang C, Greenspan A, Gershwin ME. The pathogenesis, diagnosis and clinical manifestations of steroid-induced osteonecrosis. *J Autoimmun* 2020;110. doi:10.1016/j.jaut.2020.102460.
- [49] Hakimi M, Eissa Yousef AS, Pandit H. Osteonecrosis. *Orthop Trauma* 2018. doi:10.1016/j.mporth.2018.05.006.
- [50] 1# J-PM, Shi K, Feng S-Y, Chen X-Z, He Q-Q, Zhao M-Y, et al. Cephalometric craniofacial features of patients with Sagliker syndrome: a primary analysis of our experience. *Ann Transl Med* 2021;9:963. doi:10.21037/atm-21-1544.
- [51] Mattassi R, Vaghi M. Vascular bone syndrome - Angio-osteodystrophy: Current concepts. *Phlebology* 2007;22. doi:10.1258/026835507782655263.
- [52] Palmerini E, Righi A, Staals EL. cancers Rare Primary Malignant Bone Sarcomas n.d. doi:10.3390/cancers12113092.
- [53] Whetzel PL, Noy NF, Shah NH, Alexander PR, Nyulas C, Tudorache T, et al. BioPortal: Enhanced functionality via new Web services from the National Center for Biomedical Ontology to access and use ontologies in software applications. *Nucleic Acids Res* 2011;39. doi:10.1093/nar/gkr469.
- [54] Pignolo RJ, Ramaswamy G, Fong JT, Shore EM, Kaplan FS. Progressive osseous heteroplasia: Diagnosis, treatment, and prognosis. *Appl Clin Genet* 2015;8:37–48. doi:10.2147/TACG.S51064.
- [55] Adegbite NS, Xu M, Kaplan FS, Shore EM, Pignolo RJ. Diagnostic and mutational spectrum of progressive osseous heteroplasia (POH) and other forms of GNAS-based heterotopic ossification. *Am J Med Genet Part A* 2008;146:1788–96. doi:10.1002/ajmg.a.32346.
- [56] Carter LC. Soft Tissue Calcifications and Ossifications. *Oral Radiol* 2014;524–41. doi:10.1016/B978-0-323-09633-1.00028-6.
- [57] Kottler M-L, Linglart A, Carel J-C. Albright hereditary osteodystrophy n.d.
- [58] Eddy MC, Jan de beur SM, Yandow SM, McAlister WH, Shore EM, Kaplan FS, et al. Deficiency of the alpha-subunit of the stimulatory G protein and severe extraskeletal ossification. *J Bone Miner Res* 2000;15:2074–83. doi:10.1359/JBMR.2000.15.11.2074.
- [59] Mantovani G, Bastepe M, Monk D, De Sanctis L, Thiele S, Usardi A, et al. Diagnosis and management of pseudohypoparathyroidism and related disorders: First international Consensus Statement. *Nat Rev Endocrinol* 2018;14. doi:10.1038/s41574-018-0042-0.
- [60] Vlachopapadopoulou EA, Anagnostou E, Dikaikou E, Hanna P, Tsoia M, Michalacos S, et al. Pseudohypoparathyroidism type 1B (PHP1B), a rare disorder encountered in adolescence. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2020;33. doi:10.1515/jpem-2020-0192.
- [61] Fernandez M, Zambrano MJ, Riquelme J, Castiglioni C, Kottler ML, Jüppner H, et al. Pseudohypoparathyroidism type 1B associated with assisted reproductive technology. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2017;30. doi:10.1515/jpem-2017-0226.
- [62] Thiele S, Mantovani G, Barlier A, Boldrin V, Bordogna P, Elli F, et al. From pseudohypoparathyroidism to inactivating PTH/PTHrP signaling disorder (iPPSD), a novel classification proposed by the European EuroPHP-network. *Endocr Abstr* 2016. doi:10.1530/endoabs.41.ep135.
- [63] Germain-Lee EL. Management of pseudohypoparathyroidism. *Curr Opin Pediatr* 2019;31:537. doi:10.1097/MOP.0000000000000783.
- [64] Pignolo RJ, Bedford-Gay C, Liljeström M, Durbin-Johnson BP, Shore EM, Rocke DM, et al. The Natural History of Flare-Ups in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP): A Comprehensive Global Assessment. *J Bone Miner Res* 2016;31:650–6. doi:10.1002/jbmr.2728.
- [65] Towler OW, Shore EM, Kaplan FS. Skeletal malformations and developmental arthropathy in individuals who have fibrodysplasia ossificans progressiva. *Bone* 2020;130. doi:10.1016/j.bone.2019.115116.
- [66] Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Brown MA, Kaplan FS. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet* 2006;38. doi:10.1038/ng1783.
- [67] Kaplan FS, Xu M, Seemann P, Connor JM, Glaser DL, Carroll L, et al. Classic and atypical

- fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. *Hum Mutat* 2009;30. doi:10.1002/humu.20868.
- [68] Levine MA. An update on the clinical and molecular characteristics of pseudohypoparathyroidism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012;19. doi:10.1097/MED.0b013e32835a255c.
- [69] Kaplan FS, Craver R, MacEwen GD, Gannon FH, Finkel G, Hahn G, et al. Progressive osseous heteroplasia: A distinct developmental disorder of heterotopic ossification. Two new case reports and follow-up of three previously reported cases. *J Bone Jt Surg - Ser A* 1994;76. doi:10.2106/00004623-199403000-00013.
- [70] Turan S, Bastepe M. GNAS Spectrum of Disorders. *Curr Osteoporos Rep* 2015;13:146–58. doi:10.1007/s11914-015-0268-x.
- [71] Walden U, Weissörtel R, Corria Z, Yu D, Weinstein L, Kruse K, et al. Stimulatory guanine nucleotide binding protein subunit 1 mutation in two siblings with pseudohypoparathyroidism type 1a and mother with pseudopseudohypoparathyroidism. *Eur J Pediatr* 1999;158:200–3. doi:10.1007/s004310051048.
- [72] Weinstein LS. Editorial: The stimulatory g protein α -subunit gene: Mutations and imprinting lead to complex phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4622–6. doi:10.1210/jc.86.10.4622.
- [73] Cong Q, Xu R, Yang Y. $G\alpha$ s signaling in skeletal development, homeostasis and diseases. vol. 133. 1st ed. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.11.019.
- [74] Pérez de NG, Mantovani G, Fernandez-Rebollo E. GNAS (GNAS complex locus). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2013. doi:10.4267/2042/48758.
- [75] Bastepe M. GNAS mutations and heterotopic ossification. *Bone* 2018;109:80–5. doi:10.1016/j.bone.2017.09.002.
- [76] Linglart A, Maupetit-Méhouas S, Silve C. GNAS-related loss-of-function disorders and the role of imprinting. *Horm Res Paediatr* 2013;79:119–29. doi:10.1159/000348516.
- [77] Deshpande S, Nair S, Balasinh NH. Genomic imprinting. *Epigenetics Reprod Heal* 2021;27–46. doi:10.1016/B978-0-12-819753-0.00002-7.
- [78] Reik W, Walter J. Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001;2. doi:10.1038/35047554.
- [79] Ahmed SF, Dixon PH, Bonthron DT, Stirling HF, Barr DGD, Kelnar CJH, et al. GNAS1 mutational analysis in pseudohypoparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49. doi:10.1046/j.1365-2265.1998.00572.x.
- [80] Ahrens W, Hiort O, Staedt P, Kirschner T, Marschke C, Kruse K. Analysis of the GNAS1 gene in Albright's hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4630–4. doi:10.1210/JCEM.86.10.7946.
- [81] Activating and inactivating mutations in the human GNAS1 gene - PubMed n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10980525/> (accessed June 11, 2022).
- [82] Happle R. Progressive osseous heteroplasia is not a Mendelian trait but a type 2 segmental manifestation of GNAS inactivation disorders: A hypothesis. *Eur J Med Genet* 2016;59:290–4. doi:10.1016/j.ejmg.2016.04.001.
- [83] Happle R. Progressive Osseous Heteroplasia is not an Autosomal Dominant Trait but Reflects Superimposed Mosaicism in Different GNAS Inactivation Disorders. *Indian Dermatol Online J* 2021;12:316–8. doi:10.4103/ID0J.ID0J_584_20.
- [84] Turan S, Bastepe M. The GNAS complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene. *Horm Res Paediatr* 2013;80. doi:10.1159/000355384.
- [85] Bastepe M. The GNAS Locus: Quintessential Complex Gene Encoding $G\alpha$, $XL\alpha$ s, and other Imprinted Transcripts. *Curr Genomics* 2007;8:398. doi:10.2174/138920207783406488.
- [86] Yu S, Yu D, Lee E, Eckhaus M, Lee R, Corria Z, et al. Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alpha-subunit (G α) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the g α gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8715–20. doi:10.1073/PNAS.95.15.8715.
- [87] Hayward BE, Barlier A, Korbonits M, Grossman AB, Jacquet P, Enjalbert A, et al. Imprinting of the G(s)alpha gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. *J Clin Invest* 2001;107. doi:10.1172/JCI11887.

- [88] Mantovani G, Ballare E, Giammona E, Beck-Peccoz P, Spada A. The *Gsa* gene: Predominant maternal origin of transcription in human thyroid gland and gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4736–40. doi:10.1210/jc.2002-020183.
- [89] Mantovani G, Bondioni S, Locatelli M, Pedroni C, Lania AG, Ferrante E, et al. Biallelic expression of the *Galpha* gene in human bone and adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6316–9. doi:10.1210/JC.2004-0558.
- [90] Michienzi S, Cherman N, Holmbeck K, Funari A, Collins MT, Bianco P, et al. *GNAS* transcripts in skeletal progenitors: evidence for random asymmetric allelic expression of *Gsa*. *Hum Mol Genet* 2007;16:1921–30. doi:10.1093/HMG/DDM139.
- [91] Bastepe M. The *GNAS* Locus: Quintessential Complex Gene Encoding *Gs*, *XLs*, and other Imprinted Transcripts. vol. 8. 2007.
- [92] Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. Bidirectional imprinting of a single gene: *GNAS1* encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15475–80. doi:10.1073/pnas.95.26.15475.
- [93] Peters J, Wroe SF, Wells CA, Miller HJ, Bodle D, Beechey C V., et al. A cluster of oppositely imprinted transcripts at the *Gnas* locus in the distal imprinting region of mouse chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3830–5. doi:10.1073/PNAS.96.7.3830/ASSET/2A072DA1-E1E2-41ED-BF03-DBOCF43E026D/ASSETS/GRAPHIC/PQ0694167004.JPEG.
- [94] Weiss U, Ischia R, Eder S, Lovisetti-Scamihorn P, Bauer R, Fischer-Colbrrie R. Neuroendocrine secretory protein 55 (*NESP55*): alternative splicing onto transcripts of the *GNAS* gene and posttranslational processing of a maternally expressed protein. *Neuroendocrinology* 2000;71:177–86. doi:10.1159/000054535.
- [95] Elli FM, Boldrin V, Pirelli A, Spada A, Mantovani G. The Complex *GNAS* Imprinted Locus and Mesenchymal Stem Cells Differentiation. *Horm Metab Res* 2017;49:250–8. doi:10.1055/s-0042-115305.
- [96] Kehlenbach RH, Matthey J, Huttner WB. *XL alpha s* is a new type of G protein. *Nature* 1994;372:804–9. doi:10.1038/372804A0.
- [97] Klemke M, Amalia Pasolli H, Kehlenbach RH, Offermanns S, Schultz G, Huttner WB. Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit *XLalphas*. II. Signal transduction properties. *J Biol Chem* 2000;275:33633–40. doi:10.1074/JBC.M006594200.
- [98] Hayward BE, Kamiya M, Strain L, Moran V, Campbell R, Hayashizaki Y, et al. The human *GNAS1* gene is imprinted and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95. doi:10.1073/pnas.95.17.10038.
- [99] Li T, Vu TH, Zeng ZL, Nguyen BT, Hayward BE, Bonthron DT, et al. Tissue-specific expression of antisense and sense transcripts at the imprinted *Gnas* locus. *Genomics* 2000;69:295–304. doi:10.1006/GENO.2000.6337.
- [100] Peters J, Wroe SF, Wells CA, Miller HJ, Bodle D, Beechey C V., et al. A cluster of oppositely imprinted transcripts at the *Gnas* locus in the distal imprinting region of mouse chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3830–5. doi:10.1073/PNAS.96.7.3830/ASSET/2A072DA1-E1E2-41ED-BF03-DBOCF43E026D/ASSETS/GRAPHIC/PQ0694167004.JPEG.
- [101] Plagge A, Gordon E, Dean W, Boiani R, Cinti S, Peters J, et al. The imprinted signaling protein *XL alpha s* is required for postnatal adaptation to feeding. *Nat Genet* 2004;36:818–26. doi:10.1038/NG1397.
- [102] Klemke M, Amalia Pasolli H, Kehlenbach RH, Offermanns S, Schultz G, Huttner WB. Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit *XLalphas*. II. Signal transduction properties. *J Biol Chem* 2000;275:33633–40. doi:10.1074/JBC.M006594200.
- [103] Klemke M, Kehlenbach RH, Huttner WB. Two overlapping reading frames in a single exon encode interacting proteins--a novel way of gene usage. *EMBO J* 2001;20:3849–60. doi:10.1093/EMBOJ/20.14.3849.
- [104] Freson K, Jaeken J, Van Helvoirt M, de Zegher F, Wittevrongel C, Thys C, et al. Functional polymorphisms in the paternally expressed *XLs* and its cofactor *ALEX* decrease their mutual interaction and enhance receptor-mediated cAMP formation. *Hum Mol Genet* 2003;12:1121–30. doi:10.1093/hmg/ddg130.
- [105] Swaroop A, Agarwal N, Gruen JR, Bick D, Weissman SM. Differential expression of novel *Gs alpha* signal transduction protein cDNA species. *Nucleic Acids Res* 1991;19:4725.

- doi:10.1093/NAR/19.17.4725.
- [106] Ishikawa Y, Bianchi C, Nadal-Ginard B, Homcy CJ. Alternative promoter and 5' exon generate a novel Gs alpha mRNA. *J Biol Chem* 1990;265:8458–62. doi:10.1016/S0021-9258(19)38910-0.
- [107] Wroe SF, Kelsey G, Skinner JA, Bodle D, Ball ST, Beechey C V., et al. An imprinted transcript, antisense to Nesp, adds complexity to the cluster of imprinted genes at the mouse Gnas locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3342–6. doi:10.1073/PNAS.97.7.3342/ASSET/5C1C6035-6F28-40EB-9A41-6EA4F6C5D8B9/ASSETS/GRAPHIC/PQ0500153004.JPEG.
- [108] Li T, Vu TH, Zeng ZL, Nguyen BT, Hayward BE, Bonthron DT, et al. Tissue-specific expression of antisense and sense transcripts at the imprinted Gnas locus. *Genomics* 2000;69:295–304. doi:10.1006/GENO.2000.6337.
- [109] Wu JY, Aarnisalo P, Bastepe M, Sinha P, Fulzele K, Selig MK, et al. Gsa enhances commitment of mesenchymal progenitors to the osteoblast lineage but restrains osteoblast differentiation in mice. *J Clin Invest* 2011;121:3492–504. doi:10.1172/JCI46406.
- [110] Liu JJ, Russell E, Zhang D, Kaplan FS, Pignolo RJ, Shore EM. Paternally Inherited Gsa Mutation Impairs Adipogenesis and Potentiates a Lean Phenotype In Vivo. *Stem Cells* 2012;30:1477. doi:10.1002/STEM.1109.
- [111] Sakamoto A, Chen M, Kobayashi T, Kronenberg HM, Weinstein LS. Chondrocyte-specific knockout of the G protein G(s)alpha leads to epiphyseal and growth plate abnormalities and ectopic chondrocyte formation. *J Bone Miner Res* 2005;20:663–71. doi:10.1359/JBMR.041210.
- [112] Berdeaux R, Stewart R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: Hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2012;303:1–17. doi:10.1152/AJPENDO.00555.2011/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH10091265220005.JPEG.
- [113] van Doze A, Perez DM. G-Protein-Coupled Receptors in Adult Neurogenesis. *Pharmacol Rev* 2012;64:645. doi:10.1124/PR.111.004762.
- [114] Pignolo RJ, Xu M, Russell E, Richardson A, Kaplan J, Billings PC, et al. Heterozygous inactivation of Gnas in adipose-derived mesenchymal progenitor cells enhances osteoblast differentiation and promotes heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* 2011;26:2647–55. doi:10.1002/jbmr.481.
- [115] Sinha P, Aarnisalo P, Chubb R, Ono N, Fulzele K, Selig M, et al. Loss of Gsa Early in the Osteoblast Lineage Favors Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Progenitors and Committed Osteoblast Precursors. *J Bone Miner Res* 2014;29:2414. doi:10.1002/JBMR.2270.
- [116] W.A. H, R.S. T, O. J. International workshop on the Skeletal Growth Plate Stevenson, Washington, June 11-15, 2006. *Matrix Biol* 2007;26.
- [117] Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011 131 2011;13:27–38. doi:10.1038/nrm3254.
- [118] Rutkovskiy A, Stenslkken K-O, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res* 2016;22:95–106. doi:10.12659/msmbr.901142.
- [119] Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:885–96. doi:10.1038/NRM2066.
- [120] Jumabay M, Abdmaulen R, Urs S, Heydarkhan-Hagvall S, Chazenbalk GD, Jordan MC, et al. Endothelial differentiation in multipotent cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2012;53:790–800. doi:10.1016/J.YJMCC.2012.09.005.
- [121] Lee K-S, Kim H-J, Li Q-L, Chi X-Z, Ueta C, Komori T, et al. Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor β 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. *Mol Cell Biol* 2000;20:8783–92. doi:10.1128/MCB.20.23.8783-8792.2000/ASSET/1C46E040-B914-4117-ADEF-23ADC421F8CF/ASSETS/GRAPHIC/MB2301061009.JPEG.
- [122] Pratap J, Wixted JJ, Gaur T, Zaidi SK, Dobson J, Gokul KD, et al. Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:7795–802. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1078.
- [123] Ge C, Cawthorn WP, Li Y, Zhao G, Macdougald OA, Franceschi RT. Reciprocal Control of Osteogenic and Adipogenic Differentiation by ERK/MAP Kinase Phosphorylation of Runx2 and PPAR γ Transcription Factors. *J Cell Physiol* 2016;231:587. doi:10.1002/JCP.25102.

- [124] Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose—derived stem cells in vitro and in vivo | Read by QxMD n.d. <https://read.qxmd.com/read/16969589/runx2-overexpression-enhances-osteoblastic-differentiation-and-mineralization-in-adipose-derived-stem-cells-in-vitro-and-in-vivo> (accessed June 11, 2022).
- [125] Liu H, Li X, Lin J, Lin M. Morroniside promotes the osteogenesis by activating PI3K/Akt/mTOR signaling 2021;85:332–9. doi:10.1093/bbb/zbaa010.
- [126] Zhang Z, Zhang X, Zhao D, Liu B, Wang B, Yu W, et al. TGF- β 1 promotes the osteoinduction of human osteoblasts via the PI3K/AKT/mTOR/S6K1 signalling pathway. *Mol Med Rep* 2019;49:3505–18. doi:10.3892/mmr.2019.10051.
- [127] Wu H, Wu Z, Li P, Cong Q, Chen R, Xu W, et al. Bone Size and Quality Regulation: Concerted Actions of mTOR in Mesenchymal Stromal Cells and Osteoclasts. *Stem Cell Reports* 2017;8. doi:10.1016/j.stemcr.2017.04.005.
- [128] Zhang S, Kaplan FS, Shore EM. Different roles of GNAS and cAMP signaling during early and late stages of osteogenic differentiation. *Horm Metab Res* 2012;44. doi:10.1055/s-0032-1321845.
- [129] Yeh GL, Mathur S, Wivel A, Li M, Gannon FH, Ulied A, et al. GNAS1 Mutation and Cbfa1 Misexpression in a Child with Severe Congenital Platelike Osteoma Cutis. *J Bone Miner Res* 2000;15:2063–73. doi:10.1359/JBMR.2000.15.11.2063.
- [130] Regard JB, Malhotra D, Gvozdenovic-Jeremic J, Josey M, Chen M, Weinstein LS, et al. Activation of hedgehog signaling by loss of GNAS causes heterotopic ossification. *Nat Med* 2013;19:1505–12. doi:10.1038/nm.3314.
- [131] Wang T, Chen P, Chen L, Zhou Y, Wang A, Zheng Q, et al. Reduction of mechanical loading in tendons induces heterotopic ossification and activation of the β -catenin signaling pathway. *J Orthop Transl* 2021;29:42–50. doi:10.1016/J.JOT.2021.03.004.
- [132] Wang Y, Negri S, Li Z, Xu J, Hsu CY, Peault B, et al. Anti-DKK1 Enhances the Early Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem/Stromal Cells. <https://HomeLiebertpubCom/Scd> 2020;29:1007–15. doi:10.1089/SCD.2020.0070.
- [133] Liu Q, Hu CH, Zhou CH, Cui XX, Yang K, Deng C, et al. DKK1 rescues osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with diabetes mellitus induced periodontitis. *Sci Reports* 2015 51 2015;5:1–11. doi:10.1038/srep13142.
- [134] Chen Y, Yang S, Lovisa S, Ambrose CG, McAndrews KM, Sugimoto H, et al. Type-I collagen produced by distinct fibroblast lineages reveals specific function during embryogenesis and Osteogenesis Imperfecta. *Nat Commun* 2021 121 2021;12:1–15. doi:10.1038/s41467-021-27563-3.
- [135] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (80-) 1999;284. doi:10.1126/science.284.5411.143.
- [136] Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, et al. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev Dyn* 2007;236. doi:10.1002/dvdy.21187.
- [137] Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori T. Runx2 regulates cranial suture closure by inducing hedgehog, Fgf, Wnt and Pthlh signaling pathway gene expressions in suture mesenchymal cells. *Hum Mol Genet* 2019;28. doi:10.1093/hmg/ddy386.
- [138] Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci* 2019;20. doi:10.3390/IJMS20071694.
- [139] Sun J, Li J, Li C, Yu Y. Role of bone morphogenetic protein-2 in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* 2015;12:4230–7. doi:10.3892/MMR.2015.3954/HTML.
- [140] Rawadi G, Vayssi re B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 Controls Alkaline Phosphatase Expression and Osteoblast Mineralization by a Wnt Autocrine Loop. *J Bone Miner Res* 2003;18. doi:10.1359/jbmr.2003.18.10.1842.
- [141] Xie Z, Tang S, Ye G, Wang P, Li J, Liu W, et al. Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2018;9. doi:10.1186/S13287-017-0766-0.
- [142] Iwasaki K, Komaki M, Mimori K, Leon E, Izumi Y, Ishikawa I. IL-6 induces osteoblastic differentiation of periodontal ligament cells. *J Dent Res* 2008;87:937–42. doi:10.1177/154405910808701002.
- [143] Lee YM, Fujikado N, Manaka H, Yasuda H, Iwakura Y. IL-1 plays an important role in the bone

- metabolism under physiological conditions. *Int Immunol* 2010;22:805–16. doi:10.1093/INTIMM/DXQ431.
- [144] Yu HMI, Jerchow B, Sheu TJ, Liu B, Costantini F, Puzas JE, et al. The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. *Development* 2005;132:1995. doi:10.1242/DEV.01786.
- [145] Yan Y, Tang D, Chen M, Huang J, Xie R, Jonason JH, et al. Axin2 controls bone remodeling through the β -catenin–BMP signaling pathway in adult mice. *J Cell Sci* 2009;122:3566–78. doi:10.1242/JCS.051904.
- [146] Prins HJ, Braat AK, Gawlitta D, Dhert WJA, Egan DA, Tijssen-Slump E, et al. In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res* 2014;12:428–40. doi:10.1016/J.SCR.2013.12.001.
- [147] Lee J-M, Kim M-G, Byun J-H, Kim G-C, Ro J-H, Hwang D-S, et al. The effect of biomechanical stimulation on osteoblast differentiation of human jaw periosteum-derived stem cells. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2017;39. doi:10.1186/S40902-017-0104-6.
- [148] Zhu F, Friedman MS, Luo W, Woolf P, Hankenson KD. The transcription factor osterix (SP7) regulates BMP6-induced human osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 2012;227:2677–85. doi:10.1002/JCP.23010.
- [149] Kasagi S, Chen W. TGF-beta1 on osteoimmunology and the bone component cells. *Cell Biosci* 2013;3:1–7. doi:10.1186/2045-3701-3-4/FIGURES/1.
- [150] Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 2016;4. doi:10.1038/boneres.2016.9.
- [151] Choi YA, Kim DS, Shin HI, Park EK. SMOG1-induced osteoblast differentiation involves enhanced proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Regen Med* 2014 114 2014;11:304–16. doi:10.1007/S13770-014-0021-Z.
- [152] Kannan S, Ghosh J, Dhara SK. Osteogenic differentiation potential and marker gene expression of different porcine 1 bone marrow mesenchymal stem cell subpopulations selected in different basal media n.d. doi:10.1101/2020.04.27.063230.
- [153] Cawley KM, Bustamante-Gomez NC, Guha AG, MacLeod RS, Xiong J, Gubrij I, et al. Local Production of Osteoprotegerin by Osteoblasts Suppresses Bone Resorption. *Cell Rep* 2020;32:108052. doi:10.1016/J.CELREP.2020.108052.
- [154] Cao X. RANKL-RANK signaling regulates osteoblast differentiation and bone formation. *Bone Res* 2018 61 2018;6:1–2. doi:10.1038/s41413-018-0040-9.
- [155] Zhang ZH, Jia XY, Fang JY, Chai H, Huang Q, She C, et al. Reduction of SOST gene promotes bone formation through the Wnt/ β -catenin signalling pathway and compensates particle-induced osteolysis. *J Cell Mol Med* 2020;24:4233. doi:10.1111/JCMM.15084.
- [156] Rendina-Ruedy E, Guntur AR, Rosen CJ. Intracellular lipid droplets support osteoblast function. <https://doi.org/10.1080/2162394520171356505> 2017;6:250–8. doi:10.1080/21623945.2017.1356505.
- [157] Xu JC, Wu GH, Zhou LL, Yang XJ, Liu JT. Leptin improves osteoblast differentiation of human bone marrow stroma stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20.
- [158] He S, Zhang H, Lu Y, Zhang Z, Zhang X, Zhou N, et al. Nampt promotes osteogenic differentiation and lipopolysaccharide-induced interleukin-6 secretion in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Aging (Albany NY)* 2021;13:5150. doi:10.18632/AGING.202434.
- [159] Müller DIH, Stoll C, Palumbo-Zerr K, Böhm C, Krishnacumar B, Ipseiz N, et al. PPAR δ -mediated mitochondrial rewiring of osteoblasts determines bone mass. *Sci Reports* 2020 101 2020;10:1–8. doi:10.1038/s41598-020-65305-5.
- [160] Yang J, Park OJ, Kim J, Han S, Yang Y, Yun CH, et al. Adiponectin Deficiency Triggers Bone Loss by Up-Regulation of Osteoclastogenesis and Down-Regulation of Osteoblastogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:815. doi:10.3389/FENDO.2019.00815/BIBTEX.
- [161] Wang Y, Zhang X, Shao J, Liu H, Liu X, Luo E. Adiponectin regulates BMSC osteogenic differentiation and osteogenesis through the Wnt/ β -catenin pathway. *Sci Reports* 2017 71 2017;7:1–13. doi:10.1038/s41598-017-03899-z.
- [162] Kang Q, Song WX, Luo Q, Tang N, Luo J, Luo X, et al. A Comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009;18. doi:10.1089/scd.2008.0130.

- [163] Park HW, Kim YC, Yu B, Moroishi T, Mo JS, Plouffe SW, et al. Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell* 2015;162. doi:10.1016/j.cell.2015.07.013.
- [164] Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, et al. Regulation of Wnt Signaling during Adipogenesis. *J Biol Chem* 2002;277:30998–1004. doi:10.1074/JBC.M204527200.
- [165] Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci* 2008;13. doi:10.2741/2819.
- [166] James AW, Pang S, Askarinam A, Corselli M, Zara JN, Goyal R, et al. Additive effects of sonic hedgehog and nll-1 signaling in osteogenic versus adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells Dev* 2012;21. doi:10.1089/scd.2011.0461.
- [167] Shimizu T, Tanaka T, Iso T, Matsui H, Ooyama Y, Kawai-Kowase K, et al. Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of Msx2 gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2011;286. doi:10.1074/jbc.M110.175786.
- [168] Yamaguchi K, Hayashi M, Uchida Y, Cheng XW, Nakayama T, Matsushita T, et al. Notch1 haploinsufficiency in mice accelerates adipogenesis. *Sci Reports* 2021 111 2021;11:1–14. doi:10.1038/s41598-021-96017-z.
- [169] Neubauer M, Fischbach C, Bauer-Kreisel P, Lieb E, Hacker M, Tessmar J, et al. Basic fibroblast growth factor enhances PPARgamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett* 2004;577:277–83. doi:10.1016/J.FEBSLET.2004.10.020.
- [170] Sakaue H, Konishi M, Ogawa W, Asaki T, Mori T, Yamasaki M, et al. Requirement of fibroblast growth factor 10 in development of white adipose tissue. *Genes Dev* 2002;16:908–12. doi:10.1101/GAD.983202.
- [171] Assis-Ribas T, Forni MF, Winnischofer SMB, Sogayar MC, Trombetta-Lima M. Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation. *Dev Biol* 2018;437:63–74. doi:10.1016/J.YDBIO.2018.03.002.
- [172] Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells : adipocytes or osteoblasts ? *Cell Death Differ* 2016;23:1128–39. doi:10.1038/cdd.2015.168.
- [173] Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018.
- [174] Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 2012;8:272–88. doi:10.7150/ijbs.2929.
- [175] Luu HH, Song WX, Luo X, Manning D, Luo J, Deng ZL, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2007;25. doi:10.1002/jor.20359.
- [176] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101. doi:10.1073/pnas.0403100101.
- [177] Issack PS, Helfet DL, Lane JM. Role of Wnt Signaling in Bone Remodeling and Repair n.d. doi:10.1007/s11420-007-9072-1.
- [178] Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005;15. doi:10.1038/sj.cr.7290260.
- [179] Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, Costa R, Leite CA, Barroso-Sousa R, et al. Wnt/beta-catenin pathway: Modulating anticancer immune response. *J Hematol Oncol* 2017;10. doi:10.1186/s13045-017-0471-6.
- [180] Fagotto F. Looking beyond the Wnt pathway for the deep nature of β -catenin. *EMBO Rep* 2013;14:422–33. doi:10.1038/embor.2013.45.
- [181] Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005;8:739–50. doi:10.1016/J.DEVCEL.2005.03.016.
- [182] Guo X, Day TF, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y. Wnt/ β -catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev* 2004;18:2404–17. doi:10.1101/gad.1230704.
- [183] Yuan Z, Li Q, Luo S, Liu Z, Luo D, Zhang B, et al. PPAR γ and Wnt Signaling in Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2016;11:216–25. doi:10.2174/1574888X10666150519093429.
- [184] Arango NA, Szotek PP, Manganaro TF, Oliva E, Donahoe PK, Teixeira J. Conditional deletion of β -

- catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol* 2005;288:276–83. doi:10.1016/j.ydbio.2005.09.045.
- [185] Briscoe J, Théron PP. Hedgehog (Hh) was first identified by genetic screens in *Drosophila melanogaster*. *Nat Publ Gr* 2013;14.
- [186] Simpson F, Kerr MC, Wicking C. Trafficking, development and hedgehog. *Mech Dev* 2009;126. doi:10.1016/j.mod.2009.01.007.
- [187] James AW, Leucht P, Levi B, Carre AL, Xu Y, Helms JA, et al. Sonic hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng - Part A* 2010;16. doi:10.1089/ten.tea.2010.0048.
- [188] Fontaine C, Cousin W, Plaisant M, Dani C, Peraldi P. Hedgehog Signaling Alters Adipocyte Maturation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2008;26:1037–46. doi:10.1634/stemcells.2007-0974.
- [189] James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)* 2013;2013:1–17. doi:10.1155/2013/684736.
- [190] Jia J, Tong C, Wang B, Luo L, Jiang J. Hedgehog signalling activity of smoothened requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* 2004;432. doi:10.1038/nature03179.
- [191] Le Bras A, Vijayaraj P, Oettgen P. Molecular mechanisms of endothelial differentiation. *Vasc Med* 2010;15. doi:10.1177/1358863X10371685.
- [192] Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, Gallea S, Faucheu C, Mollat P, et al. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J Cell Sci* 2001;114. doi:10.1242/jcs.114.11.2085.
- [193] Fang F, Sup M, Luzzi A, Ferrer X, Thomopoulos S. Hedgehog signaling underlying tendon and enthesis development and pathology. *Matrix Biol* 2022;105:87–103. doi:10.1016/J.MATBIO.2021.12.001.
- [194] Chen J, Long F. mTORC1 signaling promotes osteoblast differentiation from preosteoblasts. *PLoS One* 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0130627.
- [195] Perez-Alvarez MJ, Gonzalez MV, Benito-Cuesta I, Wandosell FG. Role of mTORC1 controlling proteostasis after brain ischemia. *Front Neurosci* 2018;12:60. doi:10.3389/FNINS.2018.00060/BIBTEX.
- [196] Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110. doi:10.1016/S0092-8674(02)00808-5.
- [197] Ricoult SJH, Manning BD. The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep* 2013;14. doi:10.1038/embor.2013.5.
- [198] Chen J, Long F. mTOR signaling in skeletal development and disease. *Bone Res* 2018 61 2018;6:1–6. doi:10.1038/s41413-017-0004-5.
- [199] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
- [200] Kim JK, Lee JH. Mechanistic target of rapamycin pathway in epileptic disorders. *J Korean Neurosurg Soc* 2019;62. doi:10.3340/jkns.2019.0027.
- [201] Chen G, Jiang H, Tian X, Tang J, Bai X, Zhang Z, et al. Mechanical loading modulates heterotopic ossification in calcific tendinopathy through the mTORC1 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2017;16. doi:10.3892/mmr.2017.7380.
- [202] Liu W, Wang Z, Yang J, Wang Y, Li K, Huang B, et al. Osteocyte TSC1 promotes sclerostin secretion to restrain osteogenesis in mice. *Open Biol* 2019;9. doi:10.1098/rsob.180262.
- [203] Xu Y, Huang M, He W, He C, Chen K, Hou J, et al. Heterotopic Ossification: Clinical Features, Basic Researches, and Mechanical Stimulations. *Front Cell Dev Biol* 2022;10:12. doi:10.3389/FCELL.2022.770931/BIBTEX.
- [204] Santulli G, Totary-Jain H. Tailoring mTOR-based therapy: Molecular evidence and clinical challenges. *Pharmacogenomics* 2013;14. doi:10.2217/pgs.13.143.
- [205] Chen J, Holguin N, Shi Y, Silva MJ, Long F. mTORC2 signaling promotes skeletal growth and bone formation in mice. *J Bone Miner Res* 2015;30. doi:10.1002/jbmr.2348.
- [206] Shi Y, Chen J, Kerner CM, Long F. Hedgehog signaling activates a positive feedback mechanism involving insulin-like growth factors to induce osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112. doi:10.1073/pnas.1502301112.

- [207] Zanotti S, Canalis E. Notch Signaling and the Skeleton. *Endocr Rev* 2016;37:223–53. doi:10.1210/ER.2016-1002.
- [208] Xu C, Dinh V, Kruse K, Jeong HW, Watson E, Adams S, et al. Induction of osteogenesis by bone-targeted Notch activation. *Elife* 2022;11. doi:10.7554/ELIFE.60183.
- [209] Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 2011;112:3491–501. doi:10.1002/JCB.23287.
- [210] Kopan R, Ilagan MXG. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* 2009;137:216–33. doi:10.1016/J.CELL.2009.03.045.
- [211] Takeshita K, Satoh M, Ii M, Silver M, Limbourg FP, Mukai Y, et al. Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circ Res* 2007;100. doi:10.1161/01.RES.0000254788.47304.6e.
- [212] Goriki A, Seiler R, Wyatt AW, Contreras-Sanz A, Bhat A, Matsubara A, et al. Unravelling disparate roles of NOTCH in bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2018;15. doi:10.1038/s41585-018-0005-1.
- [213] Weinmaster G, Kintner C. Modulation of Notch Signaling during Somitogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 19, 2003. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.115434.
- [214] Yu J, Canalis E. Notch and the regulation of osteoclast differentiation and function. *Bone* 2020;138. doi:10.1016/j.bone.2020.115474.
- [215] Hilton MJ, Tu X, Wu X, Bai S, Zhao H, Kobayashi T, et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med* 2008;14. doi:10.1038/nm1716.
- [216] Ramasamy SK, Kusumbe AP, Wang L, Adams RH. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature* 2014;507. doi:10.1038/nature13146.
- [217] Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 2014;507. doi:10.1038/nature13145.
- [218] Yamaguchi K, Hayashi M, Uchida Y, Cheng XW, Nakayama T, Matsushita T, et al. Notch1 haploinsufficiency in mice accelerates adipogenesis. *Sci Reports* 2021 111 2021;11:1–14. doi:10.1038/s41598-021-96017-z.
- [219] Meyers C, Lisiecki J, Miller S, Levin A, Fayad L, Ding C, et al. Heterotopic Ossification: A Comprehensive Review 2019. doi:10.1002/jbm4.10172.
- [220] Kaplan FS, Shore EM. Perspective: Progressive osseous heteroplasia. *J Bone Miner Res* 2000. doi:10.1359/jbmr.2000.15.11.2084.
- [221] Schmidt AH, Vincent KA, Aiona MD. Hemimelic progressive osseous heteroplasia. A case report. *J Bone Jt Surg - Ser A* 1994;76. doi:10.2106/00004623-199406000-00016.
- [222] Cairns DM, Pignolo RJ, Uchimura T, Brennan TA, Lindborg CM, Xu M, et al. Somitic disruption of GNAS in chick embryos mimics progressive osseous heteroplasia. *J Clin Invest* 2013;123:3624–33. doi:10.1172/JCI69746.
- [223] Breeland G, Sinkler MA, Menezes RG. Embryology, Bone Ossification. *StatPearls* 2021.
- [224] Bradley EW, McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ. Hdac-mediated control of endochondral and intramembranous ossification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2011;21:101–13.
- [225] Breeland G, Sinkler MA, Menezes RG. Embryology, Bone Ossification. *StatPearls* 2021.
- [226] Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 2011;17. doi:10.1038/nm.2448.
- [227] Boyce BF, Zuscik MJ, Xing L. Biology of Bone and Cartilage. *Genet. Bone Biol. Skelet. Dis. Second Ed.*, 2018. doi:10.1016/B978-0-12-804182-6.00011-3.
- [228] Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3 Suppl 3. doi:10.2215/CJN.04151206.
- [229] Bar-Shavit Z. The osteoclast: A multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* 2007;102. doi:10.1002/jcb.21553.
- [230] Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte Signaling in Bone n.d. doi:10.1007/s11914-012-0105-4.
- [231] Duan X, Bradbury SR, Olsen BR, Berendsen AD. VEGF stimulates intramembranous bone formation during craniofacial skeletal development. *Matrix Biol* 2016;52–54. doi:10.1016/j.matbio.2016.02.005.
- [232] Ornitz DM, Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev*

- 2015;29. doi:10.1101/gad.266551.115.
- [233] Franz-Odenaal TA. Induction and patterning of intramembranous bone. *Front Biosci* 2011;16. doi:10.2741/3882.
- [234] Zhu G, Zhang T, Chen M, Yao K, Huang X, Zhang B, et al. Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds. *Bioact Mater* 2021;6. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.03.043.
- [235] Gilbert SF. *Developmental Biology. Osteogenesis: The Development of Bones. Dev Biol* 6th Ed 2000.
- [236] Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn* 2013;242. doi:10.1002/dvdy.23992.
- [237] Pizette S, Niswander L. BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: Formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol* 2000;219. doi:10.1006/dbio.2000.9610.
- [238] Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, De Crombrugge B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 2002;16. doi:10.1101/gad.1017802.
- [239] Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003;423. doi:10.1038/nature01657.
- [240] Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP Signaling Integrates Chondrocyte Proliferation and Hypertrophic Differentiation. *Dev Cell* 2002;3:439–49. doi:10.1016/S1534-5807(02)00261-7.
- [241] Skin OIN. Heterotopic ossification in skin : Special focus on multiple miliary osteoma cutis and the role of bone morphogenetic proteins. 2013.
- [242] Xu Y, Huang M, He W, He C, Chen K, Hou J, et al. 3. *Front Cell Dev Biol* 2022;10:12. doi:10.3389/FCELL.2022.770931/BIBTEX.
- [243] Hsieh HHS, Chung MT, Allen RM, Ranganathan K, Habbouche J, Cholok D, et al. Evaluation of salivary cytokines for diagnosis of both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8. doi:10.3389/fendo.2017.00074.
- [244] Convente MR, Chakkalakal SA, Yang EJ, Caron RJ, Zhang D, Kambayashi T, et al. Depletion of Mast Cells and Macrophages Impairs Heterotopic Ossification in an Acvr1R206H Mouse Model of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *J Bone Miner Res* 2018;33:269–82. doi:10.1002/jbmr.3304.
- [245] Dilling CF, Wada AM, Lazard ZW, Salisbury EA, Gannon FH, Vadakkan TJ, et al. Vessel formation is induced prior to the appearance of cartilage in BMP-2-mediated heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* 2010;25. doi:10.1359/jbmr.091031.
- [246] Hwang C, Marini S, Huber AK, Stepien DM, Sorkin M, Loder S, et al. Mesenchymal VEGFA induces aberrant differentiation in heterotopic ossification. *Bone Res* 2019;7. doi:10.1038/s41413-019-0075-6.
- [247] Xu Y, Huang M, He W, He C, Chen K, Hou J, et al. Heterotopic Ossification: Clinical Features, Basic Researches, and Mechanical Stimulations. *Front Cell Dev Biol* 2022;10:12. doi:10.3389/FCELL.2022.770931/BIBTEX.
- [248] Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature* 2000;408:535–6. doi:10.1038/35046196.
- [249] Kan L, Lounev VY, Pignolo RJ, Duan L, Liu Y, Stock SR, et al. Substance P signaling mediates BMP-dependent heterotopic ossification. *J Cell Biochem* 2011;112:2759–72. doi:10.1002/JCB.23259.
- [250] Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010;11. doi:10.1038/ni.1923.
- [251] Ignatius A, Schoengraf P, Kreja L, Liedert A, Recknagel S, Kandert S, et al. Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1 β . *J Cell Biochem* 2011;112. doi:10.1002/jcb.23186.
- [252] Ehrthaller C, Huber-Lang M, Nilsson P, Bindl R, Redeker S, Recknagel S, et al. Complement C3 and C5 deficiency affects fracture healing. *PLoS One* 2013;8. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0081341.
- [253] Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, Cooper LF. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone* 2002;30:26–31. doi:10.1016/S8756-3282(01)00638-X.
- [254] Chakkalakal SA, Zhang D, Culbert AL, Convente MR, Caron RJ, Wright AC, et al. An Acvr1 R206H

- knock-in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Miner Res* 2012;27:1746–56. doi:10.1002/JBMR.1637.
- [255] Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med* 2012;106:9–14. doi:10.1016/j.RMED.2011.09.007.
- [256] Overed-Sayer C, Rapley L, Mustelin T, Clarke DL. Are mast cells instrumental for fibrotic diseases? *Front Pharmacol* 2014;4. doi:10.3389/FPHAR.2013.00174.
- [257] Gannon FH, Valentine BA, Shore EM, Zasloff MA KF. Acute lymphocytic infiltration in an extremely early lesion of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop Relat Res* 1998;346:19–25.
- [258] Kaplan FS, Glaser DL, Shore EM, Pignolo RJ, Xu M, Zhang Y, et al. Hematopoietic stem-cell contribution to ectopic skeletogenesis. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:347–57. doi:10.2106/JBJS.F.00472.
- [259] Ranganathan K, Agarwal S, Cholok D, Loder S, Li J, Sung Hsieh HH, et al. The role of the adaptive immune system in burn-induced heterotopic ossification and mesenchymal cell osteogenic differentiation. *J Surg Res* 2016;206:53–61. doi:10.1016/J.JSS.2016.04.040.
- [260] Rifas L. T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell differentiation and mineralization. *J Cell Biochem* 2006;98:706–14. doi:10.1002/JCB.20933.
- [261] Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29:313–25. doi:10.1089/JIR.2008.0027.
- [262] Kan SL, Yang B, Ning GZ, Chen LX, Li YL, Gao SJ, et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Prophylaxis for Heterotopic Ossification after Total Hip Arthroplasty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 2015;94. doi:10.1097/MD.0000000000000828.
- [263] Macfarlane RJ, Ng BH, Gamie Z, El Masry MA, Velonis S, Schizas C, et al. Pharmacological treatment of heterotopic ossification following hip and acetabular surgery. [Http://DxDoiOrg/101517/1465656695767](http://DxDoiOrg/101517/1465656695767) 2008;9:767–86. doi:10.1517/14656566.9.5.767.
- [264] Guañabens N, Gifre L, Peris P. The Role of Wnt Signaling and Sclerostin in the Pathogenesis of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Curr Osteoporos Reports* 2014 121 2014;12:90–7. doi:10.1007/S11914-014-0197-0.
- [265] Winkler S, Wagner F, Weber M, Matussek J, Craiovan B, Heers G, et al. Current therapeutic strategies of heterotopic ossification - a survey amongst orthopaedic and trauma departments in Germany. *BMC Musculoskelet Disord* 2015;16. doi:10.1186/s12891-015-0764-2.
- [266] Hu Y, Wang Z. Rapamycin prevents heterotopic ossification by inhibiting the mTOR pathway and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2021;573. doi:10.1016/j.bbrc.2021.07.060.
- [267] Chakraborty A, Gvozdenovic-Jeremic J, Wang F, Hoag SW, Vert-Wong E, Pearson RM. Hedgehog pathway inhibitors significantly reduce the formation of heterotopic ossification in a direct trauma/burn mouse model. *BioRxiv* 2021:2021.01.31.429058. doi:10.1101/2021.01.31.429058.
- [268] Kim B, Cho Y, Lim W. Osteoporosis therapies and their mechanisms of action (Review). *Exp Ther Med* 2021;22. doi:10.3892/etm.2021.10815.
- [269] Łęgosz P, Dreła K, Pulik Ł, Sarzyńska S, Małydyk P. Challenges of heterotopic ossification—Molecular background and current treatment strategies. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2018;45. doi:10.1111/1440-1681.13025.
- [270] Kerr K, McAneney H, Smyth LJ, Bailie C, McKee S, McKnight AJ. A scoping review and proposed workflow for multi-omic rare disease research. *Orphanet J Rare Dis* 2020;15. doi:10.1186/s13023-020-01376-x.
- [271] Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)* 2010;105:4–13. doi:10.1038/hdy.2010.54.
- [272] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33:245–54. doi:10.1038/ng1089.
- [273] Jones PA. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012;13. doi:10.1038/nrg3230.
- [274] Zhu P, Guo H, Ren Y, Hou Y, Dong J, Li R, et al. Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nat Genet* 2018;50. doi:10.1038/s41588-017-0007-6.
- [275] Van Dongen J, Gordon SD, Mcrae AF, Odintsova V V, Mbarek H, Breeze CE, et al. Identical twins

- carry a persistent epigenetic signature of early genome programming n.d. doi:10.1038/s41467-021-25583-7.
- [276] Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med* 2017;49:e322–e322. doi:10.1038/emmm.2017.10.
- [277] Phillips Theresa. The Role of Methylation in Gene Expression | Learn Science at Scitable. *Nat Educ* 2008. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/the-role-of-methylation-in-gene-expression-1070/> (accessed June 13, 2022).
- [278] Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells* 2010;28:357–64. doi:10.1002/STEM.288.
- [279] Zhang JF, Fu WM, He ML, Wang H, Wang WM, Yu SC, et al. MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix. *Mol Biol Cell* 2011;22:3955. doi:10.1091/MBC.E11-04-0356.
- [280] Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, Opriessnig P, Papak C, Ailhaud G, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:247–51. doi:10.1016/J.BBRC.2009.09.098.
- [281] Jeong Kim Y, Jin Hwang S, Chan Bae Y, Sup Jung J. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem Cells* 2009;27:3093–102. doi:10.1002/STEM.235.
- [282] Balderman JAF, Lee HY, Mahoney CE, Handy DE, White K, Annis S, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Heart Assoc* 2012;1. doi:10.1161/JAHA.112.003905.
- [283] Wu T, Zhou H, Hong Y, Li J, Jiang X, Huang H. miR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2012;287. doi:10.1074/jbc.M111.292722.
- [284] Gámez B, Rodríguez-Carballo E, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F. MicroRNA-322 (miR-322) and its target protein Tob2 modulate osterix (Ox) mRNA stability. *J Biol Chem* 2013;288. doi:10.1074/jbc.M112.432104.
- [285] Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T, Kobayashi T. Chondrocyte-Specific MicroRNA-140 Regulates Endochondral Bone Development and Targets Dnpep To Modulate Bone Morphogenetic Protein Signaling. *Mol Cell Biol* 2011;31. doi:10.1128/mcb.05178-11.
- [286] Tomé M, López-Romero P, Albo C, Seplveda JC, Fernández-Gutiérrez B, Dopazo A, et al. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 2011;18:985–95. doi:10.1038/CDD.2010.167.
- [287] Liu X, Sun Y, Constantinescu SN, Karam E, Weinberg RA, Lodish HF. Transforming growth factor beta-induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10669–74. doi:10.1073/PNAS.94.20.10669.
- [288] Pietrowska M, Wlosowicz A, Gawin M, Widlak P. MS-Based Proteomic Analysis of Serum and Plasma: Problem of High Abundant Components and Lights and Shadows of Albumin Removal. *Adv Exp Med Biol* 2019;1073:57–76. doi:10.1007/978-3-030-12298-0_3.
- [289] Kalantari S, Jafari A, Moradpoor R, Ghasemi E, Khalkhal E. Human Urine Proteomics: Analytical Techniques and Clinical Applications in Renal Diseases. *Int J Proteomics* 2015;2015. doi:10.1155/2015/782798.
- [290] Wuen Ma JY, Sze YHON, Bian JF, Lam TC. Critical role of mass spectrometry proteomics in tear biomarker discovery for multifactorial ocular diseases (Review). *Int J Mol Med* 2021;47. doi:10.3892/IJMM.2021.4916.
- [291] Álvarez J V., Bravo SB, Chantada-vázquez MP, Barbosa-gouveia S, Colón C, López-suarez O, et al. Plasma proteomic analysis in morquio a disease. *Int J Mol Sci* 2021;22. doi:10.3390/ijms22116165.
- [292] Misra BB, Langefeld C, Olivier M, Cox LA. Integrated omics: tools, advances and future approaches. *J Mol Endocrinol* 2019;62:R21–45. doi:10.1530/JME-18-0055.
- [293] Graves PR, Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:39–63. doi:10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002.
- [294] Gómez-Carballa A, Pardo-Seco J, Fachal L, Vega A, Cebey M, Martín-Torres N, et al. Indian Signatures in the Westernmost Edge of the European Romani Diaspora: New Insight from Mitogenomes. *PLoS One* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0075397.

- [295] Pardo-Seco J, Heinz T, Taboada-Echalar P, Martínón-Torres F, Salas A. Mapping the genomic mosaic of two “Afro-Bolivians” from the isolated Yungas valleys. *BMC Genomics* 2016;17. doi:10.1186/s12864-016-2520-x.
- [296] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput 2021.
- [297] Byun HM, Siegmund KD, Pan F, Weisenberger DJ, Kanel G, Laird PW, et al. Epigenetic profiling of somatic tissues from human autopsy specimens identifies tissue- and individual-specific DNA methylation patterns. *Hum Mol Genet* 2009;18. doi:10.1093/hmg/ddp445.
- [298] Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics* 2016;8:389–99. doi:10.2217/epi.15.114.
- [299] Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* 2014;30:1363–9. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTU049.
- [300] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015;43:e47–e47. doi:10.1093/NAR/GKV007.
- [301] Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw* 2008;25:1–18. doi:10.18637/JSS.V025.I01.
- [302] Kassambara A, Mundt F. Package “factoextra”. Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses 2020.
- [303] Package “methylGSA” Type Package Title Gene Set Analysis Using the Outcome of Differential Methylation 2022.
- [304] Shanliang Zhong M. Package “ctrlGene” Title Assess the Stability of Candidate Housekeeping Genes 2019. doi:10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47.
- [305] Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data n.d. doi:10.1093/bioinformatics/btw313.
- [306] Bioconductor - miRNAtap n.d. <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/miRNAtap.html> (accessed May 6, 2022).
- [307] Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005;37:495–500. doi:10.1038/NG1536.
- [308] Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 2004;18:1165–78. doi:10.1101/GAD.1184704.
- [309] Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 2003;115:787–98. doi:10.1016/S0092-8674(03)01018-3.
- [310] John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA Targets. *PLOS Biol* 2004;2:e363. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0020363.
- [311] Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res* 2015;43:D146–52. doi:10.1093/NAR/GKU1104.
- [312] Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi A J Integr Biol* 2012;16:284–7. doi:10.1089/omi.2011.0118.
- [313] Haas BJ, Zody MC. Advancing RNA-Seq analysis. *Nat Biotechnol* 2010;28. doi:10.1038/nbt0510-421.
- [314] Salas A, Marco-Puche G, Triviño JC, Gómez-Carballa A, Cebey-López M, Rivero-Calle I, et al. Strong down-regulation of glycophorin genes: A host defense mechanism against rotavirus infection. *Infect Genet Evol* 2016;44. doi:10.1016/j.meegid.2016.07.044.
- [315] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–20. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170.
- [316] Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013;29:15–21. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635.
- [317] Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience* 2021;10:1–4. doi:10.1093/GIGASCIENCE/GIAB008.
- [318] Li B, Dewey CN. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a

- reference genome. *BMC Bioinformatics* 2011;12:1–16. doi:10.1186/1471-2105-12-323/TABLES/6.
- [319] Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrá D, Di Pietro A, Nueda MJ, Ferrer A, et al. Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res* 2015;43. doi:10.1093/NAR/GKV711.
- [320] Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* 2010;11:1–9. doi:10.1186/GB-2010-11-3-R25/FIGURES/3.
- [321] Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* 2010;11:1–12. doi:10.1186/GB-2010-11-2-R14/TABLES/4.
- [322] del Pilar Chantada-Vázquez M, López AC, Bravo SB, Vázquez-Estévez S, Acea-Nebriil B, Núñez C. Proteomic analysis of the bio-corona formed on the surface of (Au, Ag, Pt)-nanoparticles in human serum. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2019;177:141–8. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.01.056.
- [323] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850–8. doi:10.1021/ac950914h.
- [324] Shilov I V., Seymour SL, Patel AA, Loboda A, Tang WH, Keating SP, et al. The paragon algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1638–55. doi:10.1074/mcp.T600050-MCP200.
- [325] Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* 2021;49:D480–9. doi:10.1093/NAR/GKAA1100.
- [326] Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2020. doi:10.1093/nar/gkz1031.
- [327] Yu G, He QY. ReactomePA: An R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol Biosyst* 2016;12. doi:10.1039/c5mb00663e.
- [328] Ortea I, Rodríguez-Ariza A, Chicano-Gálvez E, Arenas Vacas MS, Jurado Gámez B. Discovery of potential protein biomarkers of lung adenocarcinoma in bronchoalveolar lavage fluid by SWATH MS data-independent acquisition and targeted data extraction. *J Proteomics* 2016;138:106–14. doi:10.1016/j.jpropt.2016.02.010.
- [329] Garrido-Rodríguez M, Ortea I, Calzado MA, Muñoz E, García V. SWATH proteomic profiling of prostate cancer cells identifies NUSAP1 as a potential molecular target for Galiellalactone. *J Proteomics* 2019;193:217–29. doi:10.1016/j.jpropt.2018.10.012.
- [330] Ortea I, Ruiz-Sánchez I, Cañete R, Caballero-Villarraso J, Cañete MD. Identification of candidate serum biomarkers of childhood-onset growth hormone deficiency using SWATH-MS and feature selection. *J Proteomics* 2018;175:105–13. doi:10.1016/j.jpropt.2018.01.003.
- [331] Á J V, Bravo SB, Castro J De. Proteomic Analysis in Morquio A Cells Treated with Immobilized Enzymatic Replacement Therapy on Nanostructured Lipid Systems 2019.
- [332] Gartland A, Rumney RMH, Dillon JP, Gallagher JA. Isolation and Culture of Human Osteoblasts. *Methods Mol Biol* 2012;806:337–55. doi:10.1007/978-1-61779-367-7_22.
- [333] Vangipuram M, Ting D, Kim S, Diaz R, Schüle B. Skin punch biopsy explant culture for derivation of primary human fibroblasts. *J Vis Exp* 2013. doi:10.3791/3779.
- [334] Schantz J-T, Kee Woei N. A Manual for Primary Human Cell Culture. vol. 01. 1st ed. Singapore: WORLD SCIENTIFIC; 2004. doi:10.1142/5501.
- [335] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012 97 2012;9:671–5. doi:10.1038/nmeth.2089.
- [336] Stevens EL, Heckenberg G, Roberson EDO, Baugher JD, Downey TJ, Pevsner J. Inference of relationships in population data using identity-by-descent and identity-by-state. *PLoS Genet* 2011;7. doi:10.1371/journal.pgen.1002287.
- [337] Lee WC. Testing the genetic relation between two individuals using a panel of frequency-unknown single nucleotide polymorphisms. *Ann Hum Genet* 2003;67. doi:10.1046/j.1529-8817.2003.00063.x.
- [338] Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monochorionic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseus Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9. doi:10.3389/fped.2021.662669.
- [339] Ueland T. GH/IGF-I and bone resorption in vivo and in vitro. *Eur J Endocrinol* 2005;152.

- doi:10.1530/eje.1.01874.
- [340] Guntur AR, Rosen CJ. IGF-1 regulation of key signaling pathways in bone. *Bonekey Rep* 2013;2. doi:10.1038/bonekey.2013.171.
- [341] Eccleston C, Cooper TE, Fisher E, Anderson B, Wilkinson NMR. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for chronic non-cancer pain in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;2017. doi:10.1002/14651858.CD012537.
- [342] Chan SDH, Strewler GJ, Nissenson RA. Transcriptional activation of G(s) α expression by retinoic acid and parathyroid hormone-related protein in F9 teratocarcinoma cells. *J Biol Chem* 1990;265. doi:10.1016/s0021-9258(17)30470-2.
- [343] Shimono K, Morrison TN, Tung WE, Chandraratna RA, Williams JA, Iwamoto M, et al. Inhibition of ectopic bone formation by a selective retinoic acid receptor α -agonist: A new therapy for heterotopic ossification? *J Orthop Res* 2010;28. doi:10.1002/jor.20985.
- [344] Shimono K, Tung WE, MacOlin C, Chi AHT, Didizian JH, Mundy C, et al. Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor- γ agonists. *Nat Med* 2011;17. doi:10.1038/nm.2334.
- [345] Zasloff MA, Rocke DM, Crofford LJ, Hahn G V., Kaplan FS. Treatment of patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva with isotretinoin. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 346, 1998. doi:10.1097/00003086-199801000-00018.
- [346] Schuetz P, Mueller B, Christ-Crain M, Dick W, Haas H. Amino-bisphosphonates in heterotopic ossification: First experience in five consecutive cases. *Spinal Cord* 2005;43. doi:10.1038/sj.sc.3101761.
- [347] Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons K V., et al. Itraconazole, a Commonly Used Antifungal that Inhibits Hedgehog Pathway Activity and Cancer Growth. *Cancer Cell* 2010;17. doi:10.1016/j.ccr.2010.02.027.
- [348] Morales A, Nieto O, López F, Illera O, Bachiller J. Heteroplasia ósea progresiva. Una causa de osificación ectópica recién identificada. *Rev Española Reumatol* 2002;29:405–11.
- [349] Bossche L Vanden, Vanderstraeten G. HETEROTOPIC OSSIFICATION: A REVIEW n.d. doi:10.1080/16501970510027628.
- [350] Athanasou NA, Benson MKDA, Brenton DP, Smith R. Progressive osseous heteroplasia: A case report. *Bone* 1994;15:471–5. doi:10.1016/8756-3282(94)90269-0.
- [351] Franco TE, Gómez BR, Guillán FM, Alonso PA, Jorge MA. COMBINATIONS WITH THIAZOLIDINEDIONES FOR USE IN THE PREVENTION OR TREATMENT OF ABNORMAL BONE GROWTH. WO2020165101A1, 2020.
- [352] Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Case Report: Two Monochorionic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseus Heteroplasia. *Front Pediatr* 2021;9:508. doi:10.3389/FPED.2021.662669/BIBTEX.
- [353] Wang Y, Nishida S, Elalieh HZ, Long RK, Halloran BP, Bikle DD. Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 2006;21. doi:10.1359/jbmr.060610.
- [354] Kan C, Chen L, Hu Y, Ding N, Lu H, Li Y, et al. Conserved signaling pathways underlying heterotopic ossification. *Bone* 2018;109:43–8. doi:10.1016/j.bone.2017.04.014.
- [355] Fu Y, Luo N, Klein RL, Timothy Garvey W. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 2005;46. doi:10.1194/jlr.M400373-JLR200.
- [356] Fabregat A, Sidiropoulos K, Viteri G, Marin-García P, Ping P, Stein L, et al. Reactome diagram viewer: Data structures and strategies to boost performance. *Bioinformatics* 2018;34. doi:10.1093/bioinformatics/btx752.
- [357] Safran M, Rosen N, Twik M, BarShir R, Stein TI, Dahary D, et al. The GeneCards Suite. In: Abugessaisa I, Kasukawa T, editors. *Pract. Guid. to Life Sci. Databases*, Singapore: Springer Singapore; 2021, p. 27–56. doi:10.1007/978-981-16-5812-9_2.
- [358] Belinky F, Nativ N, Stelzer G, Zimmerman S, Stein TI, Safran M, et al. PathCards: Multi-source consolidation of human biological pathways. *Database* 2015;2015. doi:10.1093/database/bav006.
- [359] The Human Protein Atlas n.d.
- [360] Carvajal JJ, Crespo P, Kaoud S, Lee JY, Park SJ, Da †, et al. Muscle-Derived Lumican Stimulates Bone Formation via Integrin $\alpha 2\beta 1$ and the Downstream ERK Signal n.d. doi:10.3389/fcell.2020.565826.

- [361] Justicia-Grande AJ, Gómez-Ríal J, Rivero-Calle I, Pischedda S, Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A, et al. Corrigendum: Case Report: Two Monozygotic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia (*Front. Pediatr.*, (2021), 9, (662669), 10.3389/fped.2021.662669). *Front Pediatr* 2021;9. doi:10.3389/fped.2021.807812.
- [362] Urtizberea JA, Testart H, Cartault F, Boccon-Gibod L, Le Merrer M, Kaplan FS. Progressive osseous heteroplasia. Report of a family. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80.
- [363] Shore EM, Ahn J, De Beur SJ, Li M, Xu M, McKinlay Gardner RJ, et al. Paternally inherited inactivating mutations of the GNAS1 gene in progressive osseous heteroplasia. *N Engl J Med* 2002;346:99–106. doi:10.1056/NEJMoa011262.
- [364] Rosenfeld SR, Kaplan FS. Progressive osseous heteroplasia in male patients: Two new case reports. *Clin Orthop Relat Res* 1995;317.
- [365] Miller ES, Esterly NB, Fairley JA. Progressive Osseous Heteroplasia. *Arch Dermatol* 1996;132:787–91. doi:10.1001/ARCHDERM.1996.03890310073010.
- [366] Schrandt DE, Welting TJ, Caron MMJ, Schrandt JJP, Van Rhijn LW, Körper-Keularts I, et al. Endochondral ossification in a case of progressive osseous heteroplasia in a young female child. *J Pediatr Orthop Part B* 2014;23:477–84. doi:10.1097/BPB.0000000000000045.
- [367] Rodriguez-Jurado R, Gonzalez-Crussi F, Poznanski AK. Progressive osseous heteroplasia, uncommon cause of soft tissue ossification: A case report and review of the literature. *Fetal Pediatr Pathol* 1995;15. doi:10.3109/15513819509027017.
- [368] Khan SK, Yadav PS, Elliott G, Hu DZ, Xu R, Yang Y. Induced GnasR201H expression from the endogenous Gnas locus causes fibrous dysplasia by up-regulating Wnt/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115. doi:10.1073/pnas.1714313114.
- [369] Xu R, Khan SK, Zhou T, Gao B, Zhou Y, Zhou X, et al. G α s signaling controls intramembranous ossification during cranial bone development by regulating both Hedgehog and Wnt/ β -catenin signaling. *Bone Res* 2018;6. doi:10.1038/s41413-018-0034-7.
- [370] Spatz LB, Jin RU, Mills JC. Cellular plasticity at the nexus of development and disease. *Dev* 2021;148. doi:10.1242/dev.197392.
- [371] Horowitz MC. The role of cytokines in bone remodeling. *J Clin Densitom* 1998;1. doi:10.1385/JCD:1:2:187.
- [372] Sumi K, Abe T, Kunimatsu R, Oki N, Tsuka Y, Awada T, et al. The effect of mesenchymal stem cells on chemotaxis of osteoclast precursor cells. *J Oral Sci* 2018;60. doi:10.2334/josnusd.17-0187.
- [373] Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SRJ, Morrison NA. MCP-1-induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NF κ B ligand for bone resorption. *J Biol Chem* 2006;281:1274–85. doi:10.1074/JBC.M510156200.
- [374] Yano S, Mentaverri R, Kanuparthi D, Bandyopadhyay S, Rivera A, Brown EM, et al. Functional expression of β -chemokine receptors in osteoblasts: Role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. *Endocrinology* 2005;146. doi:10.1210/en.2005-0065.
- [375] Mulholland BS, Forwood MR, Morrison NA. SKELETAL BIOLOGY AND REGULATION (M FORWOOD AND A ROBLING, SECTION EDITORS) Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2) Drives Activation of Bone Remodelling and Skeletal Metastasis 1914. doi:10.1007/s11914-019-00545-7.
- [376] Caverzasio J, Biver E, Thouverey C. Predominant role of PDGF receptor transactivation in Wnt3a-induced osteoblastic cell proliferation. *J Bone Miner Res* 2013;28:260–70. doi:10.1002/jbmr.1748.
- [377] Hock JM, Canalis E. Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology* 1994;134:1423–8. doi:10.1210/ENDO.134.3.8119182.
- [378] Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tissues Organs* 2009;189:144–52. doi:10.1159/000151747.
- [379] Li A, Xia X, Yeh J, Kua H, Liu H, Mishina Y, et al. PDGF-AA Promotes Osteogenic Differentiation and Migration of Mesenchymal Stem Cell by Down-Regulating PDGFR α and Derepressing BMP-Smad1/5/8 Signaling. *PLoS One* 2014;9:e113785. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0113785.
- [380] Kruger TE, Miller AH, Godwin AK, Wang J. Bone sialoprotein and osteopontin in bone metastasis of

- osteotropic cancers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014;89. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.08.013.
- [381] Iwadata H, Kobayashi H, Kanno T, Asano T, Saito R, Sato S, et al. Plasma osteopontin is correlated with bone resorption markers in rheumatoid arthritis patients. *Int J Rheum Dis* 2014;17. doi:10.1111/1756-185X.12115.
- [382] Hou X, Wu X, Huang P, Zhan J, Zhou T, Ma Y, et al. Osteopontin is a useful predictor of bone metastasis and survival in patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2015;137. doi:10.1002/ijc.29540.
- [383] Si BCF J, Wang CE, Zhang DE, Wang BD, Hou AFG W, Zhou Corresponding Author Y, et al. Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases n.d. doi:10.12659/MSM.919159.
- [384] Nakamura A, Dohi Y, Akahane M, Ohgushi H, Nakajima H, Funaoka H, et al. Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2009;15:169–80. doi:10.1089/TEN.TEC.2007.0334.
- [385] Tsao Y-T, Huang Y-J, Wu H-H, Liu Y-A, Liu Y-S, Lee OK. Osteocalcin Mediates Biomineralization during Osteogenic Maturation in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Mol Sci Artic* 2017. doi:10.3390/ijms18010159.
- [386] Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New Insights into the Biology of Osteocalcin n.d. doi:10.1016/j.bone.2015.05.046.
- [387] Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and paradoxical effects of TNF- α on bone homeostasis 2014. doi:10.3389/fimmu.2014.00048.
- [388] Algate K, Haynes DR, Bartold PM, Crotti TN, Cantley MD. The effects of tumour necrosis factor- α on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. *J Periodontal Res* 2016;51:549–66. doi:10.1111/JRE.12339.
- [389] Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;13. doi:10.1038/nm1538.
- [390] Zhao B. TNF and Bone Remodeling n.d. doi:10.1007/s11914-017-0358-z.
- [391] Palhinha L, Liechocki S, Hottz ED, Pereira JA da S, de Almeida CJ, Moraes-Vieira PMM, et al. Leptin Induces Proadipogenic and Proinflammatory Signaling in Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:841. doi:10.3389/FENDO.2019.00841/BIBTEX.
- [392] Ibrahim SE, ElShishtawy HF, Helmy A, Galal ZA, Abdel Salam MH. Serum leptin concentration, bone mineral density and bone biochemical markers in a sample of Egyptian women: A possible relationship. *Egypt Rheumatol* 2011;33. doi:10.1016/j.ejr.2011.07.001.
- [393] Greenblatt MB, Tsai JN, Wein MN. Bone turnover markers in the diagnosis and monitoring of metabolic bone disease. *Clin Chem* 2017;63. doi:10.1373/clinchem.2016.259085.
- [394] Seror R, Job-Deslandre C, Kahan A. Progressive osseous heteroplasia: A rare case of late onset [2]. *Rheumatology* 2007;46:716–7. doi:10.1093/rheumatology/ke416.
- [395] Hou JW. Progressive osseous heteroplasia controlled by intravenous administration of pamidronate. *Am J Med Genet Part A* 2006;140A:910–3. doi:10.1002/AJMG.A.31200.
- [396] Cao X. Targeting osteoclast-osteoblast communication. *Nat Med* 2011;17. doi:10.1038/nm.2499.
- [397] Eriksen EF, Brixen K, Mosekilde L, Blum W, Kassem M. Growth hormone and bone. *J. Pediatr. Endocrinol.*, vol. 5, 1992. doi:10.1210/edrv.19.1.0324.
- [398] Locatelli V, Bianchi VE. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. *Int J Endocrinol* 2014;2014. doi:10.1155/2014/235060.
- [399] Corneli G, Gasco V, Prodam F, Grottoli S, Aimaretti G, Ghigo E. Growth hormone levels in the diagnosis of growth hormone deficiency in adulthood. *Pituitary* 2007;10. doi:10.1007/s11102-007-0031-0.
- [400] Pacifici M. Retinoid roles and action in skeletal development and growth provide the rationale for an ongoing heterotopic ossification prevention trial. *Bone* 2018;109:267–75. doi:10.1016/J.BONE.2017.08.010.
- [401] Hou JW. Progressive osseous heteroplasia controlled by intravenous administration of pamidronate. *Am J Med Genet Part A* 2006;140A:910–3. doi:10.1002/AJMG.A.31200.
- [402] The International Clinical Council on FOP (ICC) & Consultants (2019). n.d.
- [403] Yang J, Andre P, Ye L, Yang YZ. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int J Oral Sci*

- 2015;7:73–9. doi:10.1038/tjos.2015.14.
- [404] He X, Zhang L, Chen Y, Remke M, Shih D, Lu F, et al. The G protein α subunit $G\alpha s$ is a tumor suppressor in Sonic hedgehog–driven medulloblastoma. *Nat Med* 2014 209 2014;20:1035–42. doi:10.1038/nm.3666.
- [405] Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva: Clinical and genetic aspects. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6. doi:10.1186/1750-1172-6-80.
- [406] Qureshi AT, Dey D, Sanders EM, Seavey JG, Tomasino AM, Moss K, et al. Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Signaling with Rapamycin Prevents Trauma-Induced Heterotopic Ossification. *Am J Pathol* 2017;187. doi:10.1016/j.ajpath.2017.07.010.
- [407] Hino K, Horigome K, Nishio M, Komura S, Nagata S, Zhao C, et al. Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva 2017;127:3339–52.
- [408] Agarwal S, Loder S, Brownley C, Cholok D, Mangiavini L, Li J, et al. Inhibition of Hif1 α prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E338–47. doi:10.1073/PNAS.1515397113.
- [409] Fitter S, Matthews MP, Martin SK, Xie J, Ooi SS, Walkley CR, et al. mTORC1 Plays an Important Role in Skeletal Development by Controlling Preosteoblast Differentiation. *Mol Cell Biol* 2017;37. doi:10.1128/mcb.00668-16.
- [410] Agarwal S, Cholok D, Loder S, Li J, Breuler C, Chung MT, et al. mTOR inhibition and BMP signaling act synergistically to reduce muscle fibrosis and improve myofiber regeneration. *JCI Insight* 2016;20. doi:10.1172/jci.insight.89805.
- [411] Browne AJ, Kubasch ML, Göbel A, Hadji P, Chen D, Rauner M, et al. Concurrent antitumor and bone-protective effects of everolimus in osteotropic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2017. doi:10.1186/s13058-017-0885-7.
- [412] Gnant M, Baselga J, Rugo HS, Noguchi S, Burris HA, Piccart M, et al. Effect of everolimus on bone marker levels and progressive disease in bone in BOLERO-2. *J Natl Cancer Inst* 2013;105. doi:10.1093/jnci/djt026.
- [413] Chen J, Long F. mTOR signaling in skeletal development and disease. *Bone Res* 2018 61 2018;6:1–6. doi:10.1038/s41413-017-0004-5.
- [414] Lombardi G, Di Somma C, Rubino M, Faggiano A, Vuolo L, Guerra E, et al. The roles of parathyroid hormone in bone remodeling: prospects for novel therapeutics. *J Endocrinol Invest* 2011;34.
- [415] Kroll MH. Parathyroid hormone temporal effects on bone formation and resorption. *Bull Math Biol* 2000;62. doi:10.1006/bulm.1999.0146.
- [416] Lindsay R, Krege JH, Marin F, Jin L, Stepan JJ. Teriparatide for osteoporosis: Importance of the full course. *Osteoporos Int* 2016;27. doi:10.1007/s00198-016-3534-6.
- [417] Bastepé M, Turan S, He Q. Heterotrimeric G proteins in the control of parathyroid hormone actions. *J Mol Endocrinol* 2017;58. doi:10.1530/JME-16-0221.
- [418] Turan S. Current Nomenclature of Pseudohypoparathyroidism: Inactivating Parathyroid Hormone/Parathyroid Hormone-Related Protein Signaling Disorder. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2017;9:58–68. doi:10.4274/JCRPE.2017.S006.
- [419] Hoepfner LH, Secreto FJ, Westendorf JJ. Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13. doi:10.1517/14728220902841961.
- [420] Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood* 2009;113. doi:10.1182/blood-2008-03-145169.
- [421] Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005;280. doi:10.1074/jbc.M413274200.
- [422] Ellies DL, Viviano B, McCarthy J, Rey JP, Itasaki N, Saunders S, et al. Bone density ligand, sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *J Bone Miner Res* 2006;21. doi:10.1359/jbmr.060810.
- [423] Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* (80-) 2012;335. doi:10.1126/science.1215135.

- [424] Shen G, Ren H, Qiu T, Zhang Z, Zhao W, Yu X, et al. Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in osteoporosis. *J Cell Physiol* 2018;233. doi:10.1002/jcp.26161.
- [425] Lecka-Czernik B. Bone Loss in Diabetes: Use of Antidiabetic Thiazolidinediones and Secondary Osteoporosis. *Curr Osteoporos Reports* 2010 84 2010;8:178–84. doi:10.1007/S11914-010-0027-Y.
- [426] Gear AJL, Buckley C, Kaplan F, Vanbeek A. Multifactorial Refractory Heterotopic Ossification. *Ann Plast Surg* 2004;52:319–24. doi:10.1097/01.SAP.0000099624.04554.63.
- [427] Kan L, Liu Y, Mcguire TL, Palila Berger DM, Awatramani RB, Dymecki SM, et al. Dysregulation of Local Stem/Progenitor Cells as a Common Cellular Mechanism for Heterotopic Ossification n.d. doi:10.1634/stemcells.2008-0576.
- [428] Wei Z, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002 121 2002;12:9–18. doi:10.1038/sj.cr.7290105.
- [429] Hong L, Ai J, Ma D. Activation of Dusp14 protects against osteoclast generation and bone loss by regulating AMPK α -dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;519:445–52. doi:10.1016/J.BBRC.2019.07.091.
- [430] Wang T, Xing J, Ying Y, Tang H, Li J, Wei Y, et al. Notch1 signaling mediated dysfunction of bone marrow mesenchymal stem cells derived from cyanotic congenital heart disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;527:847–53. doi:10.1016/J.BBRC.2020.04.129.
- [431] Regan J, Long F. Notch Signaling and Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep* 2013;11:126. doi:10.1007/S11914-013-0145-4.
- [432] Maddirevula S, Alsahli S, Alhabeeb L, Patel N, Alzahrani F, Shamseldin HE, et al. Expanding the phenome and variome of skeletal dysplasia. *Genet Med* 2018;20:1609–16. doi:10.1038/GIM.2018.50.
- [433] Arechederra M, Daian F, Yim A, Bazai SK, Richelme S, Dono R, et al. Hypermethylation of gene body CpG islands predicts high dosage of functional oncogenes in liver cancer. *Nat Commun* 2018 91 2018;9:1–16. doi:10.1038/s41467-018-05550-5.
- [434] Phillips T. the role of methylation in gene expression. *Nat Educ* 2008.
- [435] Li S, Todor A, Luo R. Blood transcriptomics and metabolomics for personalized medicine. *Comput Struct Biotechnol J* 2016;14:1–7. doi:10.1016/J.CSBJ.2015.10.005.
- [436] Davy A, Soriano P. Ephrin signaling in vivo: Look both ways. *Dev Dyn* 2005;232. doi:10.1002/dvdy.20200.
- [437] Niethamer TK, Bush JO. Getting direction(s): The Eph/ephrin signaling system in cell positioning. *Dev Biol* 2019;447:42–57. doi:10.1016/J.YDBIO.2018.01.012.
- [438] Bejoy J, Bijonowski B, Marzano M, Jeske R, Ma T, Li Y. Wnt-Notch Signaling Interactions During Neural and Astroglial Patterning of Human Stem Cells. *Tissue Eng Part A* 2020;26:419. doi:10.1089/TEN.TEA.2019.0202.
- [439] Rallis C, Pinchin SM, Ish-Horowicz D. Cell-autonomous integrin control of Wnt and Notch signalling during somitogenesis. *Development* 2010;137. doi:10.1242/dev.050070.
- [440] Alfaro D, Rodríguez-sosa MR, Zapata AG. Eph/ephrin Signaling and Biology of Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *J Clin Med* 2020;9. doi:10.3390/JCM9020310.
- [441] Wu J, Luo H. Recent advances on T-cell regulation by receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Hematol* 2005;12. doi:10.1097/01.moh.0000166497.26397.9f.
- [442] Darling TK, Lamb TJ. Emerging Roles for Eph Receptors and Ephrin Ligands in Immunity. *Front Immunol* 2019;10:1473. doi:10.3389/FIMMU.2019.01473.
- [443] Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, Fotia C, Perut F, Giunti A, et al. Endothelial cells incubated with platelet-rich plasma express PDGF-B and ICAM-1 and induce bone marrow stromal cell migration. *J Orthop Res* 2009;27:1493–8. doi:10.1002/JOR.20896.
- [444] Yao Y, Cai X, Ren F, Ye Y, Wang F, Zheng C, et al. The Macrophage-Osteoclast Axis in Osteoimmunity and Osteo-Related Diseases. *Front Immunol* 2021;12. doi:10.3389/FIMMU.2021.664871.
- [445] Zhou A, Wu B, Yu H, Tang Y, Liu J, Jia Y, et al. Current Understanding of Osteoimmunology in Certain Osteoimmune Diseases. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:2144. doi:10.3389/FCELL.2021.698068/BIBTEX.
- [446] Acharya C, Yik JHN, Kishore A, Van Dinh V, Di Cesare PE, Haudenschild DR. Cartilage oligomeric

- matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: Interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biol* 2014;37. doi:10.1016/j.matbio.2014.06.001.
- [447] Coustry F, Posey KL, Maerz T, Baker K, Abraham AM, Ambrose CG, et al. Mutant cartilage oligomeric matrix protein (COMP) compromises bone integrity, joint function and the balance between adipogenesis and osteogenesis HHS Public Access. *Matrix Biol* 2018;67:75–89. doi:10.1016/j.matbio.2017.12.014.
- [448] Hecht JT, Nelson LD, Crowder E, Wang Y, Elder FFB, Harrison WR, et al. Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. *Nat Genet* 1995;10. doi:10.1038/ng0795-325.
- [449] Djouad F, Delorme B, Maurice M, Bony C, Apparailly F, Louis-Pence P, et al. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2007;9:1–12. doi:10.1186/AR2153/FIGURES/6.
- [450] Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, et al. Developmental regulation of Wnt/ β -catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem* 2005;280:19185–95. doi:10.1074/JBC.M414275200.
- [451] Horowitz MC, Tommasini SM. Fat and Bone: PGC-1 α Regulates Mesenchymal Cell Fate during Aging and Osteoporosis. *Cell Stem Cell* 2018;23:151–3. doi:10.1016/J.STEM.2018.07.010.
- [452] Yu B, Huo L, Liu Y, Deng P, Szymanski J, Li J, et al. PGC-1 α Controls Skeletal Stem Cell Fate and Bone-Fat Balance in Osteoporosis and Skeletal Aging by Inducing TAZ. *Cell Stem Cell* 2018;23:615. doi:10.1016/J.STEM.2018.09.001.
- [453] Cagnin A, Choini Ere M, Bureau NJ, Durand M, Mezghani N, Gaudreault N, et al. PGC1A is required for chondrocyte metabolism and cartilage homeostasis. *Osteoarthritis Cartil* 2020;28:S25–6. doi:10.1016/J.JOCA.2020.02.040.
- [454] Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, et al. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor- β 1. *Tissue Eng - Part A* 2011;17. doi:10.1089/ten.tea.2010.0094.
- [455] Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther* 2007;9. doi:10.1186/ar2195.
- [456] Ma B, Landman EBM, Miclea RL, Wit JM, Robanus-Maandag EC, Post JN, et al. WNT signaling and cartilage: Of mice and men. *Calcif Tissue Int* 2013;92. doi:10.1007/s00223-012-9675-5.
- [457] Liu F, Kohlmeier S, Wang CY. Wnt Signaling and Skeletal Development. *Cell Signal* 2008;20:999. doi:10.1016/J.CELLSIG.2007.11.
- [458] Usami Y, Gunawardena AT, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Wnt signaling in cartilage development and diseases: Lessons from animal studies. *Lab Invest* 2016;96. doi:10.1038/labinvest.2015.142.
- [459] Funato N, Ohtani K, Ohyama K, Kuroda T, Nakamura M. Common Regulation of Growth Arrest and Differentiation of Osteoblasts by Helix-Loop-Helix Factors. *Mol Cell Biol* 2001;21:7416. doi:10.1128/MCB.21.21.7416-7428.2001.
- [460] Kan L, Kessler JA. Evaluation of the cellular origins of Heterotopic ossification. *Orthopedics* 2014;37:329–40. doi:10.3928/01477447-20140430-07.
- [461] Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 2008;133. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.
- [462] Rutherford RB, Racenis P, Fatherazi S, Izutsu K. Bone formation by BMP-7-transduced human gingival keratinocytes. *J Dent Res* 2003;82. doi:10.1177/154405910308200410.
- [463] Gregorich ZR, Ge Y. Top-down proteomics in health and disease: Challenges and opportunities. *Proteomics* 2014;14. doi:10.1002/pmic.201300432.
- [464] Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llenze JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 2005;205. doi:10.1002/jcp.20391.
- [465] Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials* 2009;30. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.055.
- [466] Trouillas M, Prat M, Doucet C, Ernou I, Laplace-Builhé C, Blancard P Saint, et al. A new platelet cryoprecipitate glue promoting bone formation after ectopic mesenchymal stromal cell-loaded biomaterial implantation in nude mice. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:1–18.

- doi:10.1186/SCRT149/FIGURES/8.
- [467] Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M, Kassem M, Mann M. Cell Signalling: Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* (80-) 2005;308. doi:10.1126/science.1107627.
- [468] Weicht B, Maitz P, Kandler B, Fischer MB, Watzek G, Gruber R. Activated platelets positively regulate RANKL-mediated osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 2007;102:1300–7. doi:10.1002/JCB.21360.
- [469] Huang Y, Wang X, Lin H. The hypoxic microenvironment: a driving force for heterotopic ossification progression n.d. doi:10.1186/s12964-020-0509-1.
- [470] Wang H, Lindborg C, Lounev V, Kim JH, McCarrick-Walmsley R, Xu M, et al. Cellular Hypoxia Promotes Heterotopic Ossification by Amplifying BMP Signaling. *J Bone Miner Res* 2016. doi:10.1002/jbmr.2848.
- [471] Agarwal S, Loder S, Brownley C, Cholok D, Mangiavini L, Li J, et al. Inhibition of Hif1 α prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E338–47. doi:10.1073/PNAS.1515397113.
- [472] Pobanz JM, Reinhardt RA, Koka S, Sanderson SD. C5a modulation of interleukin-1 beta-induced interleukin-6 production by human osteoblast-like cells. *J Periodontal Res* 2000;35:137–45. doi:10.1034/J.1600-0765.2000.035003137.X.
- [473] Mödinger Y, Teixeira GQ, Neidlinger-Wilke C, Ignatius A. Role of the complement system in the response to orthopedic biomaterials. *Int J Mol Sci* 2018;19. doi:10.3390/ijms19113367.
- [474] Sharif PS, Abdollahi M. The role of platelets in bone remodeling. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010;9:393–9. doi:10.2174/187152810793938044.
- [475] Maitz P, Kandler B, Fischer MB, Watzek G, Gruber R. Activated platelets retain their potential to induce osteoclast-like cell formation in murine bone marrow cultures. *Platelets* 2006;17. doi:10.1080/09537100600759105.
- [476] Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63. doi:10.1016/j.joms.2004.07.016.
- [477] Sharif PS, Abdollahi M. The role of platelets in bone remodeling. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010;9:393–9. doi:10.2174/187152810793938044.
- [478] Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008. doi:10.1016/j.abb.2008.03.018.
- [479] Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.06.004.
- [480] Tiedemann K, Tsao S, Komarova S V. Platelets and osteoblasts: secretome connections. *Am J Physiol Physiol* 2022. doi:10.1152/AJPCELL.00187.2022.
- [481] Lee B, Oh Y, Jo S, Kim TH, Ji JD. A dual role of TGF- β in human osteoclast differentiation mediated by Smad1 versus Smad3 signaling. *Immunol Lett* 2019;206:33–40. doi:10.1016/J.IMLET.2018.12.003.
- [482] Yang RB, Lin FF, Yang J, Chen B, Zhang MH, Lu QP, et al. Overexpression of CAV3 facilitates bone formation via the Wnt signaling pathway in osteoporotic rats. *Endocrine* 2019;63:639–50. doi:10.1007/S12020-018-1803-1.
- [483] Hu J, Lu J, Lian G, Zhang J, Hecht JL. Filamin B Regulates Chondrocyte Proliferation and Differentiation through Cdk1 Signaling. *PLoS One* 2014;9:89352. doi:10.1371/journal.pone.0089352.
- [484] Long JT, Leinroth A, Liao Y, Ren Y, Mirando AJ, Nguyen T, et al. Hypertrophic chondrocytes serve as a reservoir for marrow-associated skeletal stem and progenitor cells, osteoblasts, and adipocytes during skeletal development. *Elife* 2022;11. doi:10.7554/ELIFE.76932.
- [485] Chen X, Zhi X, Wang J, Su J. RANKL signaling in bone marrow mesenchymal stem cells negatively regulates osteoblastic bone formation. *Bone Res* 2018 61 2018;6:1–8. doi:10.1038/s41413-018-0035-6.
- [486] Rendina-Ruedy E, Guntur AR, Rosen CJ. Intracellular lipid droplets support osteoblast function. <https://doi.org/10.1080/2162394520171356505> 2017;6:250–8. doi:10.1080/21623945.2017.1356505.
- [487] DKK1 - an overview | ScienceDirect Topics n.d. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/dkk1> (accessed June 5, 2022).

- [488] Terpos E, Gavriatopoulou M. Multiple myeloma bone disease. *Encycl Endocr Dis* 2018;329–40. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.65375-8.
- [489] Zhang ZH, Jia XY, Fang JY, Chai H, Huang Q, She C, et al. Reduction of SOST gene promotes bone formation through the Wnt/ β -catenin signalling pathway and compensates particle-induced osteolysis. *J Cell Mol Med* 2020;24:4233. doi:10.1111/JCMM.15084.
- [490] Kang JM, Rajangam T, Rhie JW, Kim SH. Characterization of cell signaling, morphology, and differentiation potential of human mesenchymal stem cells based on cell adhesion mechanism. *J Cell Physiol* 2020;235:6915–28. doi:10.1002/JCP.29587.
- [491] Srivastava S, Mishra S, Dewangan J, Divakar A, Pandey PK, Rath SK. Principles for In Vitro Toxicology. *In Vitro Toxicol* 2018;21–43. doi:10.1016/B978-0-12-804667-8.00002-X.
- [492] Roychowdhury S, Panda D, Wilson L, Rasenick MM. G protein α subunits activate tubulin GTPase and modulate microtubule polymerization dynamics. *J Biol Chem* 1999;274. doi:10.1074/jbc.274.19.13485.
- [493] Pignolo RJ, Kassem M. Circulating osteogenic cells: Implications for injury, repair, and regeneration. *J Bone Miner Res* 2011;26. doi:10.1002/jbmr.370.
- [494] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105.
- [495] Amarasekara DS, Kim S, Rho J. Molecular Sciences Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks 2021. doi:10.3390/ijms22062851.
- [496] Banu A, Liu KJ, Lax AJ, Grigoriadis AE. G-Alpha Subunit Abundance and Activity Differentially Regulate β -Catenin Signaling. *Mol Cell Biol* 2019;39. doi:10.1128/MCB.00422-18/ASSET/CC44A38F-01AF-4EA1-83F0-82E2C26A4CEA/ASSETS/GRAPHIC/MCB.00422-18-F0006.JPEG.
- [497] Kim JA, Choi HK, Kim TM, Leem SH, Oh IH. Regulation of mesenchymal stromal cells through fine tuning of canonical Wnt signaling. *Stem Cell Res* 2015;14. doi:10.1016/j.scr.2015.02.007.
- [498] Justesen J, Pedersen SB, Stenderup K, Kassem M. Subcutaneous adipocytes can differentiate into bone-forming cells in vitro and in vivo. *Tissue Eng* 2004;10:381–91. doi:10.1089/107632704323061744.
- [499] Zhang X, Yang M, Lin L, Chen P, Ma KT, Zhou CY, et al. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose--derived stem cells in vitro and in vivo. *Calcif Tissue Int* 2006;79:169–78. doi:10.1007/S00223-006-0083-6.
- [500] Lin DPL, Dass CR. Transdifferentiation of adipocytes to osteoblasts: potential for orthopaedic treatment. *J Pharm Pharmacol* 2018;70:307–19. doi:10.1111/JPHP.12862.
- [501] Stegen S, Laperre K, Eelen G, Rinaldi G, Fraisl P, Torrekens S, et al. HIF-1 α metabolically controls collagen synthesis and modification in chondrocytes. *Nature* 2019;565:511–5. doi:10.1038/S41586-019-0874-3.
- [502] Ciciarelli V, Cortellini A, Ventura A, Gutiérrez García-Rodrigo C, Ficorella C, Fagnoli MC. Rare bone toxicity associated with vismodegib. *JAAD Case Reports* 2020;6:482. doi:10.1016/J.JDCR.2020.04.029.
- [503] Grey A. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. *Osteoporos Int* 2008;19. doi:10.1007/s00198-007-0477-y.
- [504] Billington EO, Grey A, Bolland MJ. The effect of thiazolidinediones on bone mineral density and bone turnover: systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 2015;58:2238–46. doi:10.1007/S00125-015-3660-2/FIGURES/3.
- [505] Bilezikian JP, Josse RG, Eastell R, Lewiecki EM, Miller CG, Wooddell M, et al. Rosiglitazone decreases bone mineral density and increases bone turnover in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98. doi:10.1210/jc.2012-4018.
- [506] Borges JLC, Bilezikian JP, Jones-Leone AR, Acosta AP, Ambery PD, Nino AJ, et al. A randomized, parallel group, double-blind, multicentre study comparing the efficacy and safety of Avandamet (rosiglitazone/metformin) and metformin on long-term glycaemic control and bone mineral density after 80 weeks of treatment in drug-naïve type 2 d. *Diabetes, Obes Metab* 2011;13. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01461.x.
- [507] Grey A, Bolland M, Gamble G, Wattie D, Horne A, Davidson J, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: A randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92. doi:10.1210/jc.2006-2646.
- [508] Grey A, Bolland M, Fenwick S, Horne A, Gamble G, Drury PL, et al. The skeletal effects of

- pioglitazone in type 2 diabetes or impaired glucose tolerance: A randomized controlled trial. *Eur J Endocrinol* 2014;170. doi:10.1530/EJE-13-0793.
- [509] Hardy RS, Zhou H, Seibel MJ, Cooper MS. Glucocorticoids and Bone: Consequences of Endogenous and Exogenous Excess and Replacement Therapy. *Endocr Rev* 2018;39:519–48. doi:10.1210/ER.2018-00097.
- [510] Mueller KM, Hartmann K, Kaltenecker D, Vettorazzi S, Bauer M, Mauser L, et al. Adipocyte glucocorticoid receptor deficiency attenuates aging- and HFD-induced obesity and impairs the feeding-fasting transition. *Diabetes* 2017;66. doi:10.2337/db16-0381.
- [511] Lee RA, Harris CA, Wang J-C. Glucocorticoid Receptor and Adipocyte Biology. *Nucl Recept Res* 2018;5. doi:10.32527/2018/101373.
- [512] Overby H, Yang Y, Xu X, Wang S, Zhao L. Indomethacin promotes browning and brown adipogenesis in both murine and human fat cells. *Pharmacol Res Perspect* 2020;8:e00592. doi:10.1002/PRP2.592.
- [513] Styner M, Sen B, Xie Z, Case N, Rubin J. Indomethacin Promotes Adipogenesis of Mesenchymal Stem Cells Through a Cyclooxygenase Independent Mechanism. *J Cell Biochem* 2010;111:1042. doi:10.1002/JCB.22793.
- [514] Boschi F, Rizzatti V, Zamboni M, Sbarbati A. Simulating the dynamics of lipid droplets in adipocyte differentiation. *Comput Methods Programs Biomed* 2017;138:65–71. doi:10.1016/J.CMPB.2016.10.013.
- [515] Santiago F, Vieira R, Cordeiro M, Tellechea Ó, Figueiredo A. Unilateral progressive osseous heteroplasia. *Eur J Dermatology* 2009;19:214–5. doi:10.1684/ejd.2009.0634.

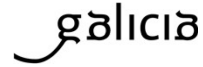
8. ANEXOS

ANEXO 1. Dictamen del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo (2019/325)



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Comité de Ética de la Investigación
Santiago Lugo



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Ana Estany Gestal, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 18 de junio de 2019 el estudio:

Título: HOPE: abordaje 'ómico' traslacional de la Heteroplasia Ósea ProgrEsiva

Versión: 1.0

Promotor/a: Federico Martínón Torres

Investigador/a: Federico Martínón Torres

Código de Registro:2019/325

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.



Y HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes.

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

Presidente

Juan Manuel Vázquez Lago. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada de Santiago.

Vicepresidenta

Pilar Rodríguez Ledo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.

Secretaria

Ana Estany Gestal. Licenciada en Farmacia. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

Secretario Suplente

Lorenzo Armenteros del Olmo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.

Vocales

María José Alfaro Águila-Real. Paciente experta. Lugo

Francisco Campos Pérez. Biólogo. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

Rosana Castelo Domínguez. Farmacéutica de Atención Primaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.

Ricardo García Martínez. Licenciado en Derecho. Área de Gestión Integrada de Lugo.

Jaime Gulín Dávila. Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.

Cristina Márquez Riveras. Enfermera. Dirección Xeral de Saúde Pública.

Guillermo José Prada Ramallal Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

Jesús Prego Domínguez. Enfermero. Área de Gestión Integrada de Santiago.

María Mercedes Rodicio García. Médico especialista en Pediatría. Área de Gestión Integrada de Lugo.

Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago.

Sandra Vidal Martínez. Enfermera. Área de Gestión Integrada de Santiago

Para que conste donde proceda, y a petición de quien proceda, en Santiago de Compostela,

La Secretaria del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

ESTANY
GESTAL ANA
46896853Z

firmado digitalmente por ESTANY
GESTAL ANA -46896853Z
Número de reconocimiento (DNE)
=E5
SerialNumber={DCES-46896853Z
signature=ANA, o=ESTANY GESTAL
cn=ESTANY GESTAL ANA -46896853Z
fecha=2019.06.20 10:16:22 +0100

 **Xacobeo 2021**

ANEXO 2. Artículo relacionado con esta tesis

Título: Case Report: Two Monochorionic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia.

Autores: Antonio José Justicia-Grande^{1,2}, José Gómez-Ríal^{1,3}, Irene Rivero-Calle^{1,4}, Sara Pischedda¹, María José Curras-Tuala¹, Alberto Gómez-Carballea¹, Miriam Cebey-López¹, Jacobo Pardo-Seco¹, Roberto Méndez-Gallart⁵, María José Fernández-Seara³, Antonio Salas^{1,6,7†} and Federico Martínón-Torres^{1,4*†}.

Afiliaciones:¹ *Genetics, Vaccines, Infectious Diseases and Pediatrics Research Group (GENVIP Group)*, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain. ² *Physical Medicine and Rehabilitation Department*, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain. ³ *Immunology Laboratory*, Clinical Laboratory, Hospital Clínico Universitario Santiago de Compostela, A Coruña, Spain. ⁴ *Translational Pediatrics and Infectious Diseases, Department of Pediatrics*, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain. ⁵ *Pediatric Surgery*, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain. ⁶ *Unidade de Xenética, Instituto de Ciencias Forenses, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela*, Santiago de Compostela, Spain. ⁷ *GenPoB Research Group*, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.

Contribuciones: AJ-G realizó la revisión de la literatura, ideó e implementó el protocolo y escribió el manuscrito original. IR-C y JG-R implementaron el protocolo y editaron el manuscrito. MC-T, SP, MC-L, AG-C y JP-S participaron en la investigación de laboratorio y la curación de datos y realizaron contribuciones vitales al documento, incluida la creación y adaptación de la tabla de tratamiento y el diagrama de flujo. MF-S y RM-G hicieron contribuciones fundamentales al manuscrito original y aprobaron la versión final. AS estuvo implicado en las pruebas genéticas, colaboró en la redacción del manuscrito original y aprobó la versión final del artículo presentado. FM-T recibió fondos para esta investigación, ideó y supervisó la aplicación del protocolo, colaboró en la redacción del manuscrito original y aprobó la versión final del artículo presentado. Todos los autores aprobaron el manuscrito final tal como fue presentado y aceptan ser responsables de todos los aspectos del trabajo.

Fecha de publicación: 23 de junio del 2021

DOI: <https://doi.org/10.3389/fped.2021.662669>

ISSN: ISSN: 2296-2360

Factor de impacto: 3.569

Quartile: Q1

Autorización de la revista para el uso del artículo: Este artículo es de acceso abierto, se permite su uso, distribución o reproducción en otros foros, siempre que se acredite al autor o autores originales y a los propietarios de los derechos de autor y se cite la publicación original en esta revista, de acuerdo con la práctica académica aceptada.



Case Report: Two Monozygotic Twins With a Critically Different Course of Progressive Osseous Heteroplasia

Antonio José Justicia-Grande^{1,2}, Jose Gómez-Rial^{1,3}, Irene Rivero-Calle^{1,4}, Sara Pischedda¹, María José Curras-Tuala¹, Alberto Gómez-Carballa¹, Miriam Cebey-López¹, Jacobo Pardo-Seco¹, Roberto Méndez-Gallart⁵, María José Fernández-Seara³, Antonio Salas^{1,6,7†} and Federico Martínón-Torres^{1,4†*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Lawrence Todd Reiter,
University of Tennessee Health
Science Center (UTHSC),
United States

Reviewed by:

Giovanna Mantovani,
University of Milan, Italy
Giovanni Battista Ferrero,
University of Turin, Italy

*Correspondence:

Federico Martínón-Torres
federico.martinon.torres@sergas.es

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Genetics of Common and Rare
Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Pediatrics

Received: 01 February 2021

Accepted: 04 May 2021

Published: 23 June 2021

Citation:

Justicia-Grande AJ, Gómez-Rial J,
Rivero-Calle I, Pischedda S,
Curras-Tuala MJ, Gómez-Carballa A,
Cebey-López M, Pardo-Seco J,
Méndez-Gallart R,
Fernández-Seara MJ, Salas A and
Martínón-Torres F (2021) Case
Report: Two Monozygotic Twins
With a Critically Different Course of
Progressive Osseous Heteroplasia.
Front. Pediatr. 9:662669.
doi: 10.3389/fped.2021.662669

¹ Genetics, Vaccines, Infectious Diseases and Pediatrics Research Group (GENVIP Group), Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, ² Physical Medicine and Rehabilitation Department, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain, ³ Immunology Laboratory, Clinical Laboratory, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain, ⁴ Translational Pediatrics and Infectious Diseases, Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain, ⁵ Pediatric Surgery, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain, ⁶ Unidade de Xenética, Instituto de Ciencias Forenses, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, ⁷ GenPoB Research Group, Instituto de Investigaciones Sanitarias, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

Progressive osseous heteroplasia (POH; OMIM 166350) is a rare autosomal-dominant genetic disorder in which extra-skeletal bone forms within skin and muscle tissue. POH is one of the clinical manifestations of an inactivating mutation in the *GNAS* gene. *GNAS* gene alterations are difficult matter to address, as *GNAS* alleles show genetic imprinting and produce several transcript products, and the same mutation may lead to strikingly different phenotypes. Also, most of the publications concerning POH patients are either clinical depictions of a case (or a case series), descriptions of their genetic background, or a tentative correlation of both clinical and molecular findings. Treatment for POH is rarely addressed, and POH still lacks therapeutic options. We describe a unique case of POH in two monozygotic twins, who presented an almost asymptomatic vs. the severe clinical course, despite sharing the same mutation and genetic background. We also report the results of the therapeutic interventions currently available for heterotopic ossification in the patient with the severe course. This article not only critically supports the assumption that the POH course is strongly influenced by factors beyond genetic background but also remarks the lack of options for patients suffering an orphan disease, even after testing drugs with promising *in vitro* results.

Keywords: progressive osseous heteroplasia, POH, treatment, genetic diseases, monozygotic twins

INTRODUCTION

Progressive osseous heteroplasia (POH; OMIM 166350) is a rare autosomal-dominant genetic disorder in which extra-skeletal bone forms within skin and muscle tissue (1). Most cases of POH are caused by heterozygous inactivating mutations of the *GNAS* gene on the paternal allele (2, 3). *GNAS* encodes the alpha subunit of the G-stimulatory protein of adenylyl cyclase (*G α*). The scarce

cases, the variability in clinical presentation, and the unpredictable evolution hamper the study of the disease, which in many cases leads to deformities, ankylosis, loss of functionality, and even amputation (4, 5).

We describe for the first time the case of two monochorionic twins suffering from POH, with almost asymptomatic vs. severe clinical course of the disease. Our aim is 2-fold: (i) to bring the focus on the different clinical evolution despite patients having an identical genetic background and (ii) to review the treatment options for severe POH and communicate our experience.

CASE PRESENTATION

Two 4-year-old monochorionic–diamniotic twins with a diagnosis of POH were referred to our practice for evaluation and follow-up. Clinical evolution and analytical findings of both siblings can be seen in **Table 1** and **Supplementary Figure 1**. Their condition as monozygotic twins was tested by carrying out whole-genome single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping (including 715,195 SNPs) of blood and saliva samples obtained from both sisters and a sample of bone plate from the severe affected twin. The statistical analyses confirmed that the twins are genetically identical and also the absence of detectable mosaicism in the tissue samples analyzed (**Supplementary Figure 2**).

Due to the rapid progression of disease and risk of permanent disability in the first twin, a review of the therapeutic options recorded in the literature was carried out and a subsequent treatment protocol was devised. The order of the therapeutic choices was established weighing the existing evidence for treatment of ectopic ossification processes against the severity of possible side effects and the disruption caused in normal life activities (**Figure 1**; **Supplementary Figure 3**). As the condition of the second twin remained stationary, interventions were only applied to the first sibling. All treatments included were approved as compassionate drug use by all the departments involved (Pediatrics, Neonatology, Endocrinology, Gastroenterology, Immunology and Infectious Diseases, Neurology, Pediatric Surgery, Dermatology, Chronic Patients Unit, Traumatology, Rehabilitation and Physiotherapy, Pharmacy, and Laboratory).

We chose to assess procollagen type I N-terminal peptide (PINP) and beta-cross lap levels during protocol follow-up. For that purpose, blood samples were drawn before starting a new treatment, fortnightly while maintaining that therapy and after drug withdrawal. Flare-ups were defined as periods of asthenia and muscular complaint that extended for five or more days, accompanied by evidence of progression of already existent lesions or formation of new ones.

Abbreviations: FOP, Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; G α , α -subunit of the G-protein; Hh, Hedgehog; HO, Heterotopic ossification; IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1; NSAIDs, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; PINP, procollagen type I N-terminal propeptide; POH- Progressive Osseous Heteroplasia; rhIGF-1, Mecasermin (recombinant human Insulin-like Growth Factor-1); SCI, Spinal Cord Injury.

A chronogram depicting the drugs administered to Patient 1 and their effects on the chosen serum markers can be found in **Figure 1**. **Table 2** resumes dosing, adverse events found, and causes for discontinuation of the selected therapies.

Our novel IGF-1 therapeutic approach was based on its role as an equipoise of bone metabolism (**Figure 1**) (6–8), it acts as a powerful regulator of osteoclastogenesis and the reabsorptive function of osteoclasts (19). Moreover, immunological experiments in animals genetically modified to nullify the expression of the gene for IGF-1 showed excessive and uncontrolled growth of bone tissue due to osteoclastic inhibition (20). After administration of IGF-1 to our patient, serum levels of substances thought to upregulate osteoclasts (Beta-crosslaps) rose by 10% (1.71 pre-intervention to 1.87 ng/ml post-intervention), whereas PINP (promoting osteoblasts) concentrations rose by 30% (from 853.6 to 1177 ng/ml). This effect is similar to the results obtained from IGF-1 administration in both healthy subjects and patients with other pathologies (21, 22).

In our case, decreased IGF-1 values seem to be the result of the underlying altered molecular pathways found in POH and not a cause or a key player. It may also be possible that subcutaneous administration of IGF-1 has no effect on bone formation or that higher doses are required to elicit a response. Our results may also be influenced by the fact that IGF-1 acts in the latter stages of bone maturation (22). Low levels of IGF-1 can also translate to an impaired GH secretion (23). Whenever tested, serum GH concentrations were found to be in adequate levels for its age in our patient, and the same happened to IGFBP-3 concentrations (a protein binding IGF-1). Although maternally derived *GNAS* mutations may lead to GHRH resistance and therefore low circulating levels of GH, most cases of POH are caused by heterozygous inactivating mutations of the *GNAS* gene on the paternal allele. What is more, alterations in paternal and maternal alleles drive to strikingly distinct phenotypes—slim in paternally—inherited mutations (as happened to our subject), and obesity in *GNAS* disturbances of maternal origin (24). We did not test the patient's response to provocative test for GH secretion; reproducibility remains an issue with these tests, and at the time of the initial assessment, the severely affected girl did not comply with the consensus criteria proposed for them (23). Our clinical and analytical work-up also suggested the absence of a concomitant hypopituitarism. Lastly, lower levels of IGF-1 can also be found in states of poor nutrition (23), and the continued bone formation of POH may have likely had an impact on metabolic expenses.

It has been suggested that retinoic acid increases the production of G α protein from the normal allele (10). Use of selective retinoic acid receptor agonist for inhibition of ectopic bone formation has been reported by Shimono et al. (11, 12). Isotretinoin, in fact, has been used for patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) (13). However, retinoic acid receptor Y agonists inhibit endochondral ossification, which may be present in up to 50% patients with POH, but the typical feature of POH is the intramembranous ossification. Future studies with another retinoic (palovarotene) in FOP may shed more light on this matter (25, 26), but both courses of topical and systemic retinoids failed in stopping disease progression in our case.

TABLE 1 | Clinical history of both patients.

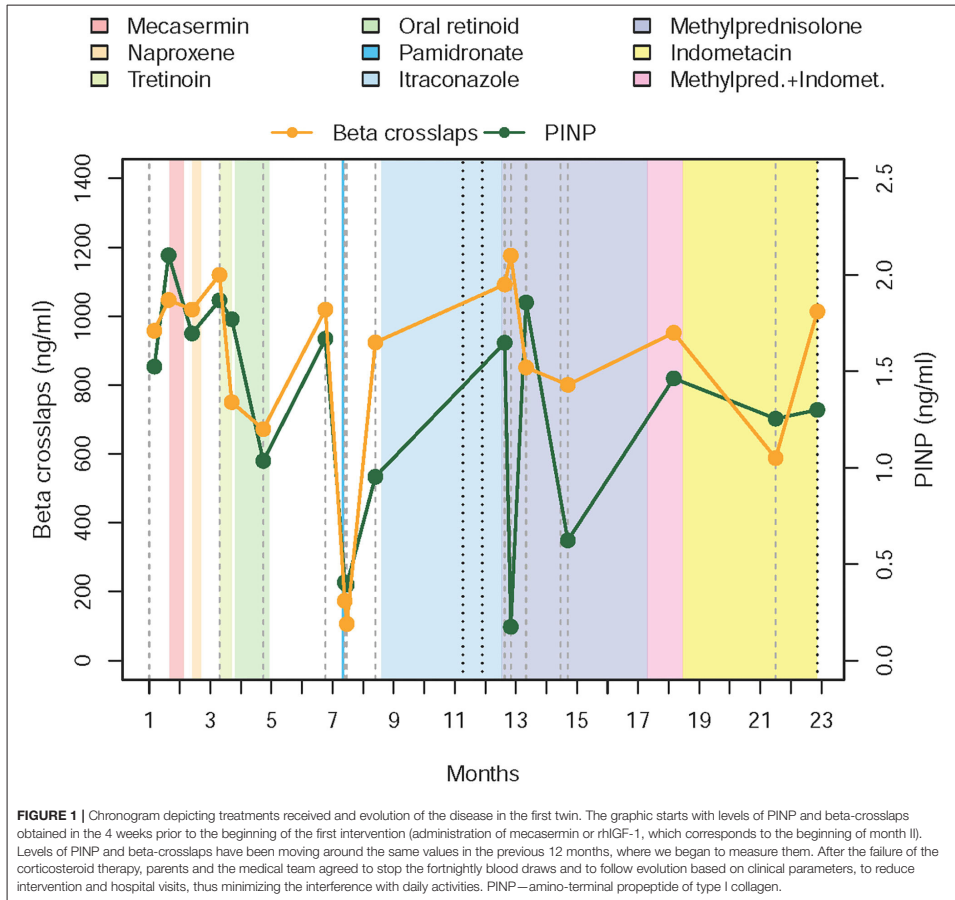
Variables	Patient 1	Patient 2
Birth	Pre-term—31 weeks of gestational age No deformities at birth	
Family history	Mother: vitiligo, hypothyroidism, migraine Father: bilateral calcifications after tearing of both Achilles' tendons No Inter-marriage between parental families	
Initial symptoms	10 weeks of extrauterine life Hard subcutaneous papules in both thighs	Three minimal subcutaneous spikes that remained stationary to date
Genetic characterization	Heterozygous missense mutation in exon 7 consisting of a 4 bp deletion (GACT; GNAS n565-568; 20q13), <i>de novo</i> mutation	
Progression of the disease	Progressed rapidly: Ankylosis of the left leg and calcification of deep tissues in the right leg, her back and the adipose tissue of both iliac fossae. At the time of their first visit to our practice, the illness started to impair joints of the right lower limb (the one still allowing walking— Supplementary Figure 1) Ibuprofen (8 mg/kg/dose) was required to mitigate pain	Remained largely unaffected by the disease. No new calcifications.
Biochemical and hematological parameters		
Insulin Growth Factor-1 (ng/mL). NR: 49-327 ng/mL	39.7	56.2
Growth hormone (ng/mL). NR: <5.00	1.28	1.07
Bone Alkaline Phosphatase (BAP) levels (mcg/L). NR: 41-134	236	122
Amino-terminal propeptide of type I collagen (PINP) (ng/mL). NR: 277-824	853.6	666.7
Beta carboxy-terminal telopeptide of type 1 collagen (beta-crosslaps) (ng/mL). NR: 0.57-1.84	1.71	1.29
Serum calcium (mg/dL). NR: 9.2-10.3	10.2	10.3
25hydroxy-vitamin D (ng/mL) NR: 12-54	25	21
Ionic phosphate (mg/dL). NR: 3.5-5.5	3.9	5
Osteocalcin (ng/mL) NR: 2.8-41	47.2	25.4
Parathyroid hormone (pg/mL) NR: 9-59	35	36
Tyroid stimulating hormone (TSH) (mIU/L). NR: 0.35-5.50	1.92	2.52
Autoantibodies		
ANA*	Negative	Negative
AMA*	Negative	Negative
ANCA*	Negative	Negative
RF* (NR 35-60UI/dL)	<35	<35
A-Sm*	Negative	Negative

The girls are monozygotic-diamniotic twins and therefore share the same genetic background.

ANA*, anti-nuclear antibodies; AMA*, anti-mitochondrial antibodies; ANCA*, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; RF*, rheumatoid factor; A-Sm*, anti-Smith antibody; NR, normal range.

Another treatment used for ectopic bone formation is thiazolidinediones, a class of antidiabetic drugs, which activate the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) that, in bone, controls cell differentiation of mesenchymal and hematopoietic lineages. Thiazolidinedione use has been linked to increased bone resorption and decrease of bone formation (27). Thus, Gatti et al. (28) used rosiglitazone (a thiazolidinedione) during a 14-month period in a 48-year-old

woman suffering from FOP, allowing a progressive tapering of the corticosteroid therapy the patient was on, and a clear improvement of joint mobility and skin softness. However, in our case, rosiglitazone was not considered due to its unknown security profile for children as young as our patient. Moreover, so far, results of an open-label study designed for further testing the effects of rosiglitazone in FOP remain undisclosed (29). It is noteworthy that this



therapeutic approach is currently considered still occasionally [e.g., see the last consensus for medical management of FOP (26)].

Biphosphonates, such as Etidronate, block the mineralization of the bone matrix. In our patient, disease progression (measured by the formation of new lesions and progression of older ones) was not modified by administration of intravenous pamidronate, despite a decrease in markers of bone remodeling. Larger courses of Pamidronate are associated with “freezing” of bone metabolism, decreasing bone formation, as well as resorption (14). But for treating active flares of ectopic bone formation, evidence of such “freezing” is feeble (16, 30, 31). Etidronate has also been used for the prevention of

heterotopic ossification (HO), and it seemed to retard osteoid calcification, as ossification continued when bisphosphonate was discontinued (32), because matrix formation remains unaffected (17). Despite some authors reporting pamidronate to ameliorate FOP symptoms in up to three quarters of their patients, current FOP management guidelines inform of the limited long-term utility of this approach, as repeated infusions may lead to fractures in the normal bone and biphosphonates seem to offer no protective effects against future flare-ups (26). In any case, we were not able to provide further doses of pamidronate and test the effects of a greater cumulative dosage, as pamidronate infusion was accompanied of numerous adverse events mimicking symptoms of active disease (asthenia, myalgia,

TABLE 2 | Drugs used in Patient 1.

Drug	Dose	Mechanism	AL	Adverse events	Cause of discontinuation	References
Mecasermin (rhIGF-1)	0.04 mg/day	rhIGF-I	15	No	Worsened serum markers; same clinical	(6–8)
Naproxen	100 mg	NSAIDs	40	Aphthous ulcers	Aphthous ulcers	(9)
Topical Tretinoin	0.10% 0.025%	Retinoid: Stimulation of G α expression at a transcriptional level	10	Red, swollen rash in the chosen regions	Ossification over the scapula grew	(10–12)
Oral acitretin	10 mg/day		90	No	Coalescence of bony spikes of the back and progression of the plate over the left scapula, as well as appearance of new spikes surrounding the abdominal plates.	(13)
Pamidronate	2.5 mg/kg	Bisphosphonate: Slows the release of calcium, blocking the mineralization of the bone matrix	3	Worsened myalgia and asthenia and onset of low-grade fever	Manifestations of POH progressed	(14)
Itraconazole	6.6 mg/kg/q.d. 9.5 mg/kg/q.d.	Antifungal: acts as a potent suppressor of the Hh signaling pathway	90 30		Biochemical markers of bone formation returned to previous levels, and absence of clinical improvement in the disease progression	(15)
Methylprednisolone	20 mg/kg/q.d. Slow tapering	Corticosteroid hormone	5 180		Absence of clinical improvement in the disease progression, despite reuction of markers of bone formation after the initial bolus.	(2, 16)
Indomethacin	3 mg/kg/b.i.d. 4 mg/kg/b.i.d.	NSAIDs	180		Currently on indomethacin.	(17, 18)

AL, administration length (days); b.i.d, bis in die (twice daily); q.d, quaque die (once a day).

pain when standing, early fatigability, etc.) lasting more than a week.

Hedgehog (Hh) signaling is required in both endochondral and intramembranous ossification (33). In normal soft tissues, G α inhibits Hh signaling and restricts spatially the bone formation to the normal skeleton. Hh upregulation is both necessary and sufficient to induce HO (34). At the same time, the loss of G α inhibition on Hh signaling can lead to the development of medulloblastoma (35). Itraconazole is an orally administered antifungal that acts as a potent suppressor of the Hh signaling pathway. The same dosage used for treating fungal infections inhibits the growth of medulloblastoma in mouse allograft models (15). To the best of our knowledge, there are no previous reports of itraconazole use in HO (26), but being itraconazole a drug frequently used in immunosuppressed children, it was ruled into the protocol. Disappointingly, after four months on itraconazole, the patient presented the formation of two new plates and the progression of older ones, and the drug was discontinued.

Corticosteroids are drugs with immunomodulatory and anti-inflammatory potential. Dosages of 2 mg/kg/once daily for four days are indicated for FOP as first-line treatment at the

beginning of the flare-ups (26, 36). It is reported that up to 55% of subjects suffering from FOP experiment have some kind of symptom improvement after its use, but current protocols advise against its long-term use and restrict this treatment option to flare-ups impairing mobility of major joints, to primary prevention after severe trauma or whenever undergoing a surgery (26). We infused a high dose of corticosteroid (20 mg/kg of daily intravenous methylprednisolone, for five days) followed by a slow six-month tapering period. Although chemical parameters of bone formation dropped, laboratory findings were not accompanied by any modification of visible ectopic bone formation. A course of oral corticosteroids was previously offered by Morales et al. (16) to their patient to no benefit.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) like indomethacin are supposed to inhibit prostaglandin production, avoiding mesenchymal cell differentiation. Its use in the prevention of HO after hip arthroplasty (17) and spinal cord injury (SCI) (32) is well-established. On the other hand, evidence for this therapeutic approach for flare-up prevention in FOP is lacking (26). Indomethacin has been previously tried on another POH patient (18), but it did

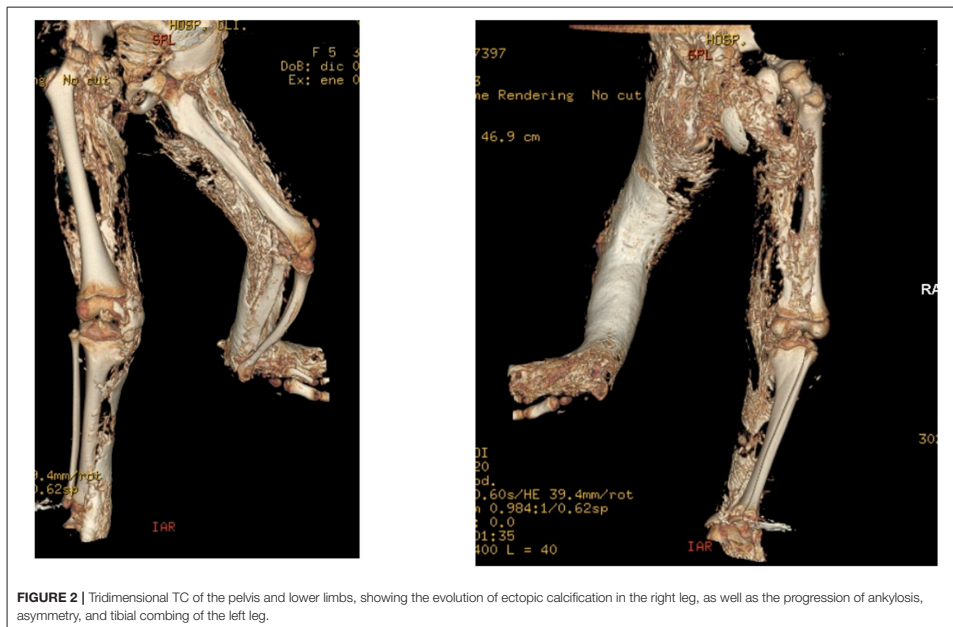


FIGURE 2 | Tridimensional TC of the pelvis and lower limbs, showing the evolution of ectopic calcification in the right leg, as well as the progression of ankylosis, asymmetry, and tibial combing of the left leg.

not stop worsening. Despite receiving indomethacin for the last 14 months, our patient presented two flare-up periods and recurrence of the bony plate under the surgical incision (Figure 2 and Supplementary Figure 4). Also, we lack data on PINP and beta-crosslaps during indomethacin administration, as regular blood tests were discontinued to avoid further visits.

Our report is not the first one communicating the astonishingly different clinical expression of the disease in two siblings (37) nor within one family (38), but to the best of our knowledge is the only one with POH affecting two identical twins carrying the same mutation at the *GNAS* gene. It was known that a specific mutation pattern within *GNAS* could not predict the severity nor progression of the disease (39–41), but until today, we have no evidence that two patients with identical genetic backgrounds could have such a different evolution.

Laboratory tests are therefore of limited utility in POH patients (16, 42–49). Markers that show an increased bone turnover have been reported by Seror et al. (30) and Hou (31). We found a huge unbalance between PINP and beta-crosslaps, but we could not correlate their values with disease activity. Through most of follow-up, levels of PINP were constantly elevated, save for the periods following administration of pamidronate and methylprednisolone. Although a blatant decrease of both

parameters was seen after bisphosphonate infusion, and that drop of PINP was accompanied by a rise in bone resorption when pulses of methylprednisolone were given, in no case that change in concentration of biochemical markers was followed by a relapse of the disease. It is also worth noting that IGF-1 remains low two years after discontinuation of its ectopic administration (63 ng/ml, normal range 80–233 ng/ml).

Hypermetabolism, ankylosis of left leg, and retraction in right inferior member have taken their toll on Patient 1, who is progressively separating from her height and weight percentiles. Lesions can recur after surgical removal (16, 18, 43, 50), as happened to our patient. So far, none of our therapeutic approaches worked. This may be due to insufficient dosage, but the most likely reason is that the nature of POH ossification is different from that induced by FOP and HO, together with our unknowledge of the pathological model that drives ectopic bone formation in POH. There have been reports of other potential treatments, like radiation therapy (14, 51) and Imatinib (26, 52–54), but the effects of their use in children with disseminated ectopic bone formation would be deleterious. Using a control group for POH patients is utopic, even for our case, who had his genetic identical twin developing a total distinct phenotype but remains largely unaffected. To date, diligent skin care and physical therapies are the only recommendations we can make (47), and sharing our experience on this blatantly ignored entity

may help others to overcome the lack of information on *in vivo* results.

CONCLUSIONS

We presented a unique case of POH in two genetically identical patients with totally discordant clinical courses. They confirm that another unknown molecular mechanism beyond a *GNAS* mutation should be accountable for this wide phenotype variation. We failed at finding any medication that could ameliorate the symptoms of POH.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethical Committee of Clinical Investigation of Galicia (CEIC ref. 2019/325). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AJ-G conducted the literature review, devised and implemented the protocol, and wrote the original manuscript. IR-C and JG-R implemented the protocol and edited the manuscript. MC-T, SP, MC-L, AG-C, and JP-S were implied in laboratory research and data curation and made vital contributions to the paper, including the creation and adaptation of the treatment table and flow chart. MF-S and RM-G made fundamental contributions to the original manuscript and approved the final version. AS was implied in genetic testing, collaborated in writing the original manuscript, and approved the final version of the submitted paper. FM-T was granted funding for this research, devised, and supervised the application of the protocol, collaborated in writing the original manuscript, and approved the final version of the submitted paper. All authors approved the final manuscript as submitted and agree to be accountable for all aspects of the work.

FUNDING

This study received support from the Instituto de Salud Carlos III (Proyecto de Investigación en Salud, Acción Estratégica en Salud): project GePEM ISCIII/PI16/01478/Cofinanciado FEDER) (AS) and project ReSVinext ISCIII/PI16/01569/Cofinanciado FEDER (FM-T); Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia (RH107/2-intensificación actividad investigadora, PS09749 and 10PXIB918184PR), Instituto de Salud Carlos III (Intensificación de la actividad investigadora 2007–2012, PI16/01569), Fondo de Investigación Sanitaria (FIS; PI070069/PI11000540) del plan

nacional de I + D + I and fondos FEDER (FM-T), and 2016-PG071 Consolidación e Estructuración REDES 2016GI-1344 G3VIP (Grupo Gallego de Genética Vacunas Infecciones y Pediatría, 3) (AS and FM-T).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Loló and Eduardo, parents of the patients and paragons of comprehension and strength, and to all the supporters and founders of the Asociación Gallega de Heteroplasia Ósea Progresiva (Galician Progressive Osseous Heteroplasia Association, <http://asgpho.com>) they have launched.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2021.662669/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | This AP radiographs the evident web-like pattern of the POH. This reflects the clinical situation of the patient before starting the different treatments. Note the affected growth of the left leg, ankylosis of left knee and ankle, luxation of several joints of the left lower limb and foot (knee, ankle, tarso-metatarsal, etc.), and combing, resorption, remodeling, and cortical fractures of large bones. Also, a bony plate is visible in the dermis over the right knee. Although palpable, at that time, it did not greatly impair mobility of this joint.

Supplementary Figure 2 | Heatmap of identity-by-descent (IBD) values represented as $p(\text{IBD} = 2) + 0.5 \times p(\text{IBD} = 1)$ obtained from pairwise genome profile comparisons of the samples collected from the patients (coded as P1 and P2 in the figure). The data indicate that both sisters are genetically identical and do not show detectable mosaicism in the samples analyzed. IBD values for all pairs of genetic profiles are compatible with a twin relationship or samples coming from the same biological source (55); according to the Lee test (56), this relationship is highly statistically significant (p -value $< 10^{-16}$ in all pairwise comparisons). We used the Applied Biosystems™ Axiom™ Spain Biobank Array to genotype blood and saliva samples from Patient 1 and Patient 2, and a bone plate sample from the severely affected Patient 1. IBD values for all pairwise comparisons were obtained for a total of 715,195 SNPs. To infer kinship relations based on the genome evidence, we followed the procedures previously described in (57, 58). We used 10 random Spanish genomes profiles obtained from The 1,000 Genomes Project (IBS-1000G) (indicated with prefix "HG" in the figure) as reference samples for IBD computation.

Supplementary Figure 3 | Original flowchart of therapeutic options after IGF-1 administration for Patient 1. rhIGF-1 was the first treatment provided due to the persistent low levels detected since her birth. NSAIDs were provided for symptomatic relief whenever necessary. Our protocol also involved the extraction of blood samples previous to, during, and after stopping treatment, and, whenever a plate required removal, the storage of both calcified and surrounding mesenchymal tissue for *in vitro* treatment testing.

Supplementary Figure 4 | Taken before starting corticoid therapy. It shows the progression of heterotopic bone formation in the right lower limb, especially over the medial surface of the tibia. Calcification has affected also part of the right ankle and the dermis over the adductors. The asymmetry between both lower limbs is evident (it has progressed since the initial radiograph), as well as ankylosis of both left knee and ankle. The surgical incision is the result of the removal of a bony abdominal plate that caused pain when sitting, which coupled with the impossibility of prolonged standing due to evident motives and impacted heavily on the quality of life. Shortly after taking this image, the patient underwent an orthopedic surgery for liberating the right knee, whose movements were also limited. The right leg was the one allowing walking in the patient after total ankylosis of the left leg.

REFERENCES

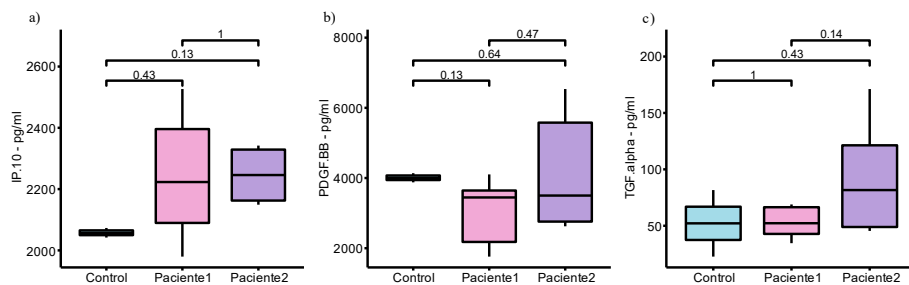
- Kaplan FS, Craver R, MacEwen GD, Gannon FH, Finkel G, Hahn G, et al. Progressive osseous heteroplasia: a distinct developmental disorder of heterotopic ossification. Two new case reports and follow-up of three previously reported cases. *J Bone Joint Surg Am.* (1994) 76:425–36. doi: 10.2106/00004623-199403000-00013
- Pignolo RJ, Xu M, Russell E, Richardson A, Kaplan J, Billings PC, et al. Heterozygous inactivation of Gnas in adipose-derived mesenchymal progenitor cells enhances osteoblast differentiation and promotes heterotopic ossification. *J Bone Miner Res.* (2011) 26:2647–55. doi: 10.1002/jbmr.481
- Shore EM, Ahn J, De Beur SJ, Li M, Xu M, Gardner RM, et al. Paternally inherited inactivating mutations of the GNAS1 gene in progressive osseous heteroplasia. *J N Engl J Med.* (2002) 346:99–106. doi: 10.1056/NEJMoa011262
- Schmidt AH, Vincent KA, Aiona MD. Hemimelic progressive osseous heteroplasia. A case report. *J Bone Joint Surg Am.* (1994) 76:907–12. doi: 10.2106/00004623-199406000-00016
- Aynaci O, Aynaci FM, Cobanoglu Ü, Alpay K. Progressive osseous heteroplasia. A case report and review of the literature. *J Pediatr Orthop B.* (2002) 11:339–42. doi: 10.1097/01202412-200210000-00013
- Ueland T. GH/IGF-I and bone resorption *in vivo* and *in vitro*. *Eur J Endocrinol.* (2005) 152:327–32. doi: 10.1530/eje.1.01874
- Cao X. Targeting osteoclast-osteoblast communication. *Nat Med.* (2011) 17:1344–6. doi: 10.1038/nm.2499
- Guntur AR, Rosen CJ. IGF-1 regulation of key signaling pathways in bone. *Bonekey Rep.* (2013) 2:437. doi: 10.1038/bonekey.2013.171
- Eccleston C, Cooper TE, Fisher E, Anderson B, Wilkinson NM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for chronic non-cancer pain in children and adolescents. *Cochr Database Syst Rev.* (2017) 8:CD012537. doi: 10.1002/14651858.CD012537
- Chan S, Strewler GJ, Nissenson RA. Transcriptional activation of Gs alpha expression by retinoic acid and parathyroid hormone-related protein in F9 teratocarcinoma cells. *J Biol Chem.* (1990) 265:20081–4. doi: 10.1016/S0021-9258(17)30470-2
- Shimono K, Morrison TN, Tung W, Chandraratna RA, Williams JA, Iwamoto M, et al. Inhibition of ectopic bone formation by a selective retinoic acid receptor α -agonist: A new therapy for heterotopic ossification? *J Orthop Res.* (2010) 28:271–7. doi: 10.1002/jor.20985
- Shimono K, Tung W-e, Macolino C, Chi AH-T, Didizian JH, Mundy C, et al. Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor- γ agonists. *Nat Med.* (2011) 17:454. doi: 10.1038/nm.2334
- Zasloff MA, Rocke D, Crofford LJ, Hahn GV, Kaplan FS. Treatment of patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva with 13-cis-retinoic acid (Isotretinoin). *Clin Orthop Relat Res.* (1998) 346:18. doi: 10.1097/00003086-199801000-00018
- Schuetz P, Mueller B, Christ-Crain M, Dick W, Haas H. Amino-bisphosphonates in heterotopic ossification: first experience in five consecutive cases. *Spinal Cord.* (2005) 43:604–10. doi: 10.1038/sj.sc.31.01761
- Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, et al. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell.* (2010) 17:388–99. doi: 10.1016/j.ccr.2010.02.027
- Morales A, Nieto O, López F, Illera O, Bachiller J. Heteroplasia ósea progresiva. Una causa de osificación ectópica recién identificada. *Rev Esp Reumatol.* (2002) 29:405–11. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-reumatologia-29-articulo-heteroplasia-osea-progresiva-una-causa-13039155>
- Bosch LV, Vanderstraeten G. Heterotopic ossification: a review. *J Rehabil Med.* (2005) 37:129–36. doi: 10.1080/16501970510027628
- Athanasou NA, Benson MK, Brenton BP, Smith R. Progressive osseous heteroplasia: a case report. *Bone.* (1994) 15:471–5. doi: 10.1016/8756-3282(94)90269-0
- Wang Y, Nishida S, Elalieh HZ, Long RK, Halloran BP, Bikle DD, et al. Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* (2006) 21:1350–8. doi: 10.1359/jbmr.060610
- Bucanas KL, Mian AI, Demmler-Harrison GJ, Caviness AC, Piedra PA, Franco LM, et al. Global gene expression profiling in infants with acute respiratory syncytial virus bronchitis demonstrates systemic activation of interferon signaling networks. *Pediatr Infect Dis J.* (2013) 32:e68–76. doi: 10.1097/INF.0b013e318278b4b3
- Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotwec MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev.* (1998) 19:55–79. doi: 10.1210/edrv.19.1.0324
- Locatelli V, Bianchi VE. Effect of GH/IGF-1 on bone metabolism and osteoporosis. *Int J Endocrinol.* (2014) 2014:235060. doi: 10.1155/2014/235060
- Corneli G, Gasco V, Prodam F, Grottole S, Aimaretti G, Ghigo EJP. Growth hormone levels in the diagnosis of growth hormone deficiency in adulthood. *J Pituitary.* (2007) 10:141–9. doi: 10.1007/s11102-007-0031-0
- Yu S, Gavrilova O, Chen H, Lee R, Liu J, Pacak K, et al. Paternal versus maternal transmission of a stimulatory G-protein α subunit knockout produces opposite effects on energy metabolism. *J Clin Invest.* (2000) 105:615–23. doi: 10.1172/JCI8437
- Pacifici M. Retinoid roles and action in skeletal development and growth provide the rationale for an ongoing heterotopic ossification prevention trial. *Bone.* (2018) 109:267–75. doi: 10.1016/j.bone.2017.08.010
- The International Clinical Council on FOP (ICC) & Consultants (2019). Available online at: http://www.iccfop.org/dvlp/wp-content/uploads/2020/03/Guidelines_January-2020.pdf (accessed April 22, 2021).
- Lecka-Czernik B. Bone loss in diabetes: use of antidiabetic thiazolidinediones and secondary osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* (2010) 8:178–84. doi: 10.1007/s11914-010-0027-y
- Gatti D, Viapiana O, Rossini M, Silvano A. Rosiglitazone therapy is associated with major clinical improvements in a patient with fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Miner Res.* (2010) 25:1460–2. doi: 10.1359/jbmr.091113
- The European Union Clinical Trials Register (2011). Available online at: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2011-002516-85/IT> (accessed April 22, 2021).
- Seror R, Job-Deslandre C, Kahan A. Progressive osseous heteroplasia: a rare case of late onset. *Rheumatology (Oxford).* (2007) 46:716–7. doi: 10.1093/rheumatology/kel416
- Hou J. Progressive osseous heteroplasia controlled by intravenous administration of pamidronate. *Am J Med Genet A.* (2006) 140:910–3. doi: 10.1002/ajmg.a.31200
- Banovac K, Williams J, Patrick L, Haniff Y. Prevention of heterotopic ossification after spinal cord injury with indomethacin. *Spinal Cord.* (2001) 39:370–4. doi: 10.1038/sj.sc.3101166
- Yang J, Andre P, Ye L, Yang Y-Z. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int J Oral Sci.* (2015) 7:73–9. doi: 10.1038/ijos.2015.14
- Regard JB, Malhotra D, Gvozdenovic-Jeremic J, Josey M, Chen M, Weinstein LS, et al. Activation of Hedgehog signaling by loss of GNAS causes heterotopic ossification. *Nat Med.* (2013) 19:1505–12. doi: 10.1038/nm.3314
- He X, Zhang L, Chen Y, Remke M, Shih D, Lu F, et al. The G protein α subunit $G\alpha s$ is a tumor suppressor in Sonic hedgehog-driven medulloblastoma. *Nat Med.* (2014) 20:1035–42. doi: 10.1038/nm.3666
- Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical and genetic aspects. *Orphanet J Rare Dis.* (2011) 6:1–6. doi: 10.1186/1750-1172-6-80
- Urtizberea JA, Testart H, Cartault F, Boccon-Gibod L, Le Merrer M, Kaplan FS, et al. Progressive osseous heteroplasia: report of a family. *J Bone Joint Surg Br.* (1998) 80:768–71. doi: 10.1302/0301-620X.80B5.0800768
- Shore EM, Kaplan FS. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. *J Nat Rev Rheumatol.* (2010) 6:518. doi: 10.1038/nrnheum.2010.122
- Happle R. Progressive osseous heteroplasia is not a Mendelian trait but a type 2 segmental manifestation of GNAS inactivation disorders: a hypothesis. *Eur J Med Genet.* (2016) 59:290–4. doi: 10.1016/j.ejmg.2016.04.001
- Kotler M-L, editor. Paternal GNAS mutations: which phenotypes? What genetic counseling? *Ann Endocrinol (Paris).* (2015) 76:105–9. doi: 10.1016/j.ando.2015.03.010
- Adegbite NS, Xu M, Kaplan FS, Shore EM, Pignolo RJ. Diagnostic and mutational spectrum of progressive osseous heteroplasia (POH) and other forms of GNAS-based heterotopic ossification. *Am J Med Genet A.* (2008) 146A:1788–96. doi: 10.1002/ajmg.a.32346
- Elli FM, Barbieri A, Bordogna P, Ferrari P, Bufò R, Ferrante E, et al. Screening for GNAS genetic and epigenetic alterations in progressive osseous heteroplasia: first Italian series. *Bone.* (2013) 56:276–80. doi: 10.1016/j.bone.2013.06.015

43. Kaplan FS, Shore EM. Progressive osseous heteroplasia. *J Bone Miner Res.* (2000) 15:2084–94. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.11.2084
44. Kumagai K, Motomura K, Egashira M, Tomita M, Suzuki M, Uetani M, et al. A case of progressive osseous heteroplasia: a first case in Japan. *Skeletal Radiol.* (2008) 37:563–7. doi: 10.1007/s00256-008-0469-9
45. Santiago F, Veira R, Cordeiro M, Tellechea O, Figueiredo A. Unilateral progressive osseous heteroplasia. *Eur J Dermatol.* (2009) 19:214–5. doi: 10.1684/ejd.2009.0634
46. Singh GK, Verma V. Progressive osseous heteroplasia in a 10-year-old male child. *Indian J Orthop.* (2011) 45:280–2. doi: 10.4103/0019-5413.80050
47. Mantovani G, Bastepe M, Monk D, De Sanctis L, Thiele S, Usardi A, et al. Diagnosis and management of pseudohypoparathyroidism and related disorders: first international Consensus Statement. *Nat Rev Endocrinol.* (2018) 14:476–500. doi: 10.1038/s41574-018-0042-0
48. Chan I, Hamada T, Hardman C, McGrath J, Child FJ. Progressive osseous heteroplasia resulting from a new mutation in the GNAS1 gene. *Clin Exp Dermatol.* (2004) 29:77–80. doi: 10.1111/j.1365-2230.2004.01439.x
49. Schimmel R, Pasmans S, Xu M, Stadhouders-Keet S, Shore E, Kaplan F, et al. GNAS-associated disorders of cutaneous ossification: two different clinical presentations. *Bone.* (2010) 46:868–72. doi: 10.1016/j.bone.2009.11.001
50. Gear AJ, Buckley C, Kaplan F, Vanbeek AJA. Multifactorial refractory heterotopic ossification. *Ann Plast Surg.* (2004) 52:319–24. doi: 10.1097/01.sap.0000099624.04554.63
51. Cipriano C, Pill SG, Rosenstock J, Keenan MA. Radiation therapy for preventing recurrence of neurogenic heterotopic ossification. *Orthopedics.* (2009) 32:685. doi: 10.3928/01477447-20090728-33
52. Werner CM, Zimmermann SM, Würzler-Hauri CC, Lane JM, Wanner GA, Simmen H-P. Use of imatinib in the prevention of heterotopic ossification. *HSS J.* (2013) 9:166–70. doi: 10.1007/s11420-013-9335-y
53. Dierks C, Beigi R, Guo G-R, Zirlik K, Stegert MR, Manley P, et al. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell.* (2008) 14:238–49. doi: 10.1016/j.ccr.2008.08.003
54. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature.* (2009) 458:776–9. doi: 10.1038/nature07737
55. Stevens EL, Heckenberg G, Roberson ED, Baugher JD, Downey TJ, Pevsner J. Inference of relationships in population data using identity-by-descent and identity-by-state. *J PLoS Genet.* (2011) 7:e1002287. doi: 10.1371/journal.pgen.1002287
56. Lee WC. Testing the genetic relation between two individuals using a panel of frequency-unknown single nucleotide polymorphisms. *Ann Hum Genet.* (2003) 67:618–9. doi: 10.1046/j.1529-8817.2003.00063.x
57. Gómez-Carballa A, Pardo-Seco J, Fachal L, Vega A, Cebej M, Martínón-Torres N, et al. Indian signatures in the westernmost edge of the European romani diaspora: new insight from mitogenomes. *PLoS ONE.* (2013) 8:e75397. doi: 10.1371/journal.pone.0075397
58. Pardo-Seco J, Heinz T, Taboada-Echalar P, Martínón-Torres F, Salas A. Mapping the genomic mosaic of two 'Afro-Bolivians' from the isolated Yungas valleys. *BMC Genom.* (2016) 17:1–12. doi: 10.1186/s12864-016-2520-x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

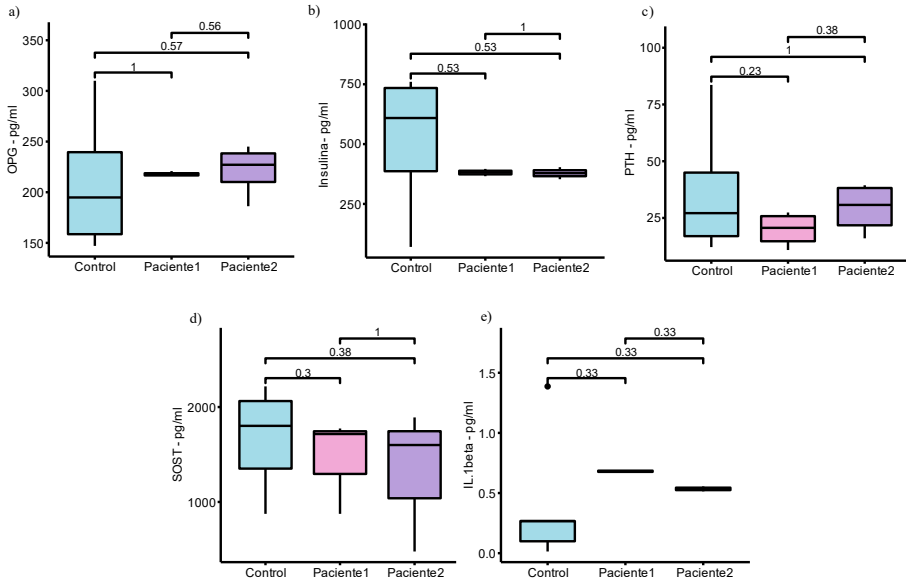
Copyright © 2021 Justicia-Grande, Gómez-Rial, Rivero-Calle, Pischedda, Curras-Tuala, Gómez-Carballa, Cebej-López, Pardo-Seco, Méndez-Gallart, Fernández-Seara, Salas and Martínón-Torres. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO 3. Marcadores de osteoinmunidad en suero de pacientes con HOP vs controles



Representación de los niveles séricos de las citoquinas: a) (IP.10); b) Factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF.BB; c) (TGF- α); obtenidos mediante inmunoensayos MILLIPLEX.

ANEXO 4. Medición de marcadores séricos relacionados con el metabolismo óseo en la Paciente1 vs Paciente2



Representación de los niveles séricos de los marcadores de metabolismo óseo: a) Osteoprogertina (OPG); b) Insulina; c) Hormona Paratiroidea (PTH); d) Esclerostina (SOST) y e) Interleucina 1-beta; obtenidos mediante inmunoensayo MILLIPIX.

ANEXO 5. Correlación entre parámetros analíticos y los niveles de Everolimus en sangre de la Paciente1

Variable	Coefficiente de correlación de Pearson	P-valor
Leucocitos	-0,218	0,400
Hemáties	0,441	0,077
Hemoglobina	0,188	0,470
Hematocrito	0,144	0,580
VCM ^a	-0,155	0,554
HCM ^b	-0,132	0,615
CHCM ^c	0,106	0,686
Plaquetas	-0,323	0,205
VPM ^d	-0,165	0,526
Microcíticos	0,046	0,860
Hipocrómicos	0,007	0,980
Neutrófilos	-0,333	0,191
Linfocitos	0,226	0,383
Monocitos	-0,113	0,665
Eosinófilos	0,223	0,389
Basófilos	0,197	0,448
LUC ^e	-0,174	0,504
VSG ^f	0,400	0,112
Glucosa	0,720	0,001
Urea	0,084	0,748
Ácido úrico	-0,502	0,040
Creatinina	0,367	0,148
Sodio	0,187	0,473
Potasio	0,029	0,913
Bilirrubina total	-0,133	0,624
AST ^g	0,006	0,980
ALT ^h	0,095	0,716
GGT ⁱ	0,038	0,915
Proteínas totales	0,406	0,106
Albumina	0,555	0,021
Calcio	0,450	0,081
Colesterol	0,432	0,095
Triglicéridos	0,418	0,095

^aVolúmen Corpuscular Medio; ^bHemoglobina Corpuscular Media; ^cConcentración de Hemoglobina Corpuscular media; ^dVolúmen Plaquetario Medio; ^eCélulas grandes no teñidas, por sus siglas en inglés; ^fVelocidad de Sedimentación Globular; ^gAspartato aminotransferasa; ^hAlanina aminotransferasa; ⁱGamma-glutamyl transferasa

ANEXO 6. Posiciones diferencialmente metiladas de la Paciente1 comparada con la Paciente2

	Chr	Posición	Nombre de la isla	Isla	Gen	Grupo	P-valor	Delta Beta
cg09323788	chr16	843219	chr16:843069-843391	Isla	CHTF18	Cuerpo del gen	3,38x10 ⁻⁰³	-0,453
cg06749803	chr1	2360074	chr1:2359926-2360167	Isla	-	-	6,82x10 ⁻⁰³	-0,135
cg09296044	chr15	43477606	chr15:43477588-43477816	Isla	CCNDBP1	Exon1; Cuerpo del gen; TSS1500; 5'UTR	7,76x10 ⁻⁰³	-0,135
cg09218773	chr11	619014	chr11:617226-617797	S_Shore	MUPCDH	Cuerpo del gen	6,44x10 ⁻⁰³	-0,124
cg09802223	chr11	64330428	chr11:64329520-64329825	S_Shore	SLC22A11	Cuerpo del gen	2,98x10 ⁻⁰³	-0,117
cg01642264	chrX	133654656	-	OpenSea	-	-	5,89x10 ⁻⁰³	-0,115
cg01166932	chr15	57698073	-	OpenSea	CGNL1	5'UTR	2,59x10 ⁻⁰³	-0,114
cg18379490	chr1	233243505	-	OpenSea	PCNXL2	Cuerpo del gen	9,16x10 ⁻⁰³	-0,112
cg05492387	chr4	99298930	-	OpenSea	RAP1GDS	Cuerpo del gen	1,65x10 ⁻⁰³	-0,111
cg12572748	chr14	55739560	chr14:55737940-55738999	S_Shore	FBXO34	5'UTR	8,52x10 ⁻⁰³	-0,110
cg08678397	chr7	63016104	chr7:63016936-63017286	N_Shore	-	-	1,01x10 ⁻⁰³	-0,109
cg13726109	chr10	73502394	-	OpenSea	CDH23	Cuerpo del gen	8,84x10 ⁻⁰³	-0,107
cg00995988	chr9	130495533	chr9:130497262-130497846	N_Shore	TOR2A	3'UTR; Cuerpo del gen	3,67x10 ⁻⁰³	-0,106
cg15955354	chr4	125174087	-	OpenSea	-	-	6,92x10 ⁻⁰³	-0,102
cg10881311	chr2	107481444	-	OpenSea	ST6GAL2	5'UTR	3,88x10 ⁻⁰³	-0,100
cg09374346	chr15	78835713	chr15:78832664-78833295	S_Shelf	PSMA4	5'UTR; Cuerpo del gen	9,56x10 ⁻⁰³	0,100
cg23876991	chr16	87781498	-	OpenSea	KLHDC4	Cuerpo del gen	5,72x10 ⁻⁰³	0,100
cg11406875	chr3	122283150	chr3:122283002-122283594	Isla	PARP9	5'UTR; Exon1; TSS200	5,86x10 ⁻⁰³	0,101
cg23797252	chr10	135014804	chr10:135014703-135015402	Isla	KNDC1	Cuerpo del gen	5,63x10 ⁻⁰³	0,103
cg08337959	chr11	1948933	chr11:1948915-1949188	Isla	TNNT3	Cuerpo del gen	3,56x10 ⁻⁰³	0,104
cg07531569	chr8	62564004	-	OpenSea	ASPH	Cuerpo del gen	3,93x10 ⁻⁰³	0,104
cg04837616	chr17	75880542	chr17:75883803-75884328	N_Shelf	FLJ45079	TSS1500	7,99x10 ⁻⁰³	0,105
cg16510040	chr1	40042432	chr1:40041317-40042667	Isla	PABPC4	5'UTR; Exon1	1,06x10 ⁻⁰³	0,106
cg10936323	chr5	60240838	chr5:60240779-60241490	Isla	NDUFAF2;ERCC8	TSS200; Exon1; 5'UTR	1,06x10 ⁻⁰³	0,107
cg15242048	chr2	233788622	chr2:233791783-233793922	N_Shelf	NGEF	Cuerpo del gen	9,37x10 ⁻⁰³	0,108
cg00059399	chr5	2008272	chr5:2008187-2008428	Isla	-	-	3,20x10 ⁻⁰³	0,109
cg02866454	chr10	7453455	chr10:7449376-7455339	Isla	SFMBT2	TSS200	4,85x10 ⁻⁰³	0,109
cg00321357	chr18	71708666	-	OpenSea	-	-	5,36x10 ⁻⁰³	0,109
cg02269643	chr14	70701025	chr14:70700814-70701050	Isla	-	-	2,84x10 ⁻⁰³	0,110
cg07081633	chr10	133449580	chr10:133449492-133449716	Isla	-	-	7,97x10 ⁻⁰³	0,111
cg25362652	chr6	106429769	chr6:106429111-106429772	Isla	-	-	6,29x10 ⁻⁰³	0,112
cg02317313	chr12	122235206	chr12:122235106-122235310	Isla	LOC338799	Cuerpo del gen	2,35x10 ⁻⁰³	0,113

	Chr	Posición	Nombre de la isla	Isla	Gen	Grupo	P-valor	Delta Beta
cg17152375	chrX	48660379	chrX:48659712-48660629	Isla	HDAC6	TSS200	2,46x10 ⁻⁰³	0,114
cg11164649	chr17	47297130	chr17:47296969-47297314	Isla	ABI3	Cuerpo del gen	7,29x10 ⁻⁰³	0,115
cg19980771	chr6	110798022	chr6:110797297-110798201	Isla	SLC22A16	TSS200	8,75x10 ⁻⁰³	0,115
cg13850847	chr9	136131739	chr9:136131001-136131831	Isla	ABO	Cuerpo del gen	7,99x10 ⁻⁰³	0,120
cg05107468	chr5	88120210	-	OpenSea	MEF2C	TSS1500; 5'UTR	5,82x10 ⁻⁰³	0,120
cg13874969	chr15	26874480	chr15:26874097-26874528	Isla	GABRB3	TSS200; Cuerpo del gen; 5'UTR	6,99x10 ⁻⁰³	0,120
cg00654159	chr16	32858241	chr16:32857241-32858277	Isla	-	-	9,77x10 ⁻⁰³	0,121
cg06155303	chr1	29460817	chr1:29460810-29461172	Isla	-	-	7,68x10 ⁻⁰³	0,122
cg12376047	chr2	63277001	chr2:63274475-63279430	Isla	LOC100132215;OTX1	TSS1500; TSS200	6,32x10 ⁻⁰³	0,125
cg02886208	chr11	14281011	chr11:14280741-14281164	Isla	SPON1	Cuerpo del gen	1,55x10 ⁻⁰³	0,127
cg24671891	chrX	12601783	chrX:12601482-12601832	Isla	FRMPD4	Cuerpo del gen	8,53x10 ⁻⁰³	0,128
cg23815306	chr5	891843	chr5:892522-893479	N_Shore	TRIP13;BRD9	TSS1500; Cuerpo del gen	1,29x10 ⁻⁰⁴	0,131
cg15750303	chr2	18765848	chr2:18765745-18766180	Isla	NT5C1B	Cuerpo del gen	6,97x10 ⁻⁰³	0,131
cg12606933	chr5	157078573	chr5:157078327-157079564	Isla	SOX30	Exon1	3,29x10 ⁻⁰³	0,133
cg08286799	chr16	89989483	chr16:89988830-89989746	Isla	TUBB3	TSS1500	2,87x10 ⁻⁰⁴	0,138
cg07895437	chr6	33282971	chr6:33282855-33283196	Isla	ZBTB22;TAPBP	Cuerpo del gen; TSS1500	7,96x10 ⁻⁰³	0,139
cg14200350	chr9	35690051	chr9:35689610-35691101	Isla	TPM2	Exon1; 5'UTR	3,58x10 ⁻⁰³	0,139
cg12771053	chr1	155145617	chr1:155145342-155145938	Isla	TRIM46;KRTCAP2	TSS1500; Cuerpo del gen	1,04x10 ⁻⁰⁴	0,139
cg14605520	chr9	139094350	chr9:139090420-139095472	Isla	LHX3	Cuerpo del gen	8,24x10 ⁻⁰³	0,142
cg11839415	chr1	43814764	chr1:43814305-43815277	Isla	MPL	Cuerpo del gen	2,68x10 ⁻⁰³	0,142
cg14907788	chr19	2555976	chr19:2555751-2556146	Isla	GNNG7	5'UTR	3,58x10 ⁻⁰³	0,144
cg09117448	chr16	31439393	chr16:31438891-31439682	Isla	COX6A2	Cuerpo del gen	5,58x10 ⁻⁰³	0,150
cg22878388	chr2	105853796	chr2:105853493-105853797	Isla	-	-	1,99x10 ⁻⁰⁴	0,167
cg21400344	chr1	25870172	chr1:25869893-25871042	Isla	LDLRAP1	5'UTR; 1stExon	1,02x10 ⁻⁰⁴	0,167
cg06864047	chr7	97839870	chr7:97839862-97840222	Isla	-	-	1,34x10 ⁻⁰³	0,175
cg10505257	chr16	4731639	chr16:4731561-4731835	Isla	MGRN1	Cuerpo del gen	5,89x10 ⁻⁰³	0,189

Chr, cromosoma. Posiciones diferencialmente metiladas: (p-valor <0,01 y Delta Beta>0,10).

ANEXO 7. Anotaciones de las tres posiciones diferencialmente metiladas significativas del gen *GNAS*

Posición	Nombre de la isla	Número de acceso	Grupo	Tránsito	Proteína	P valor	Delta-Beta	
cg03264550	57465448	chr20: 57463652-57467739	NM_001077490	3'UTR	variante 2	Proteína ALEX isoforma Alex	0,01623	-0,05828
			NM_000516	TSS1500	variante 1	Proteína GNAS isoforma GNASL		
			NM_001077488	TSS1500	variante 6	Proteína GNAS isoforma f		
			NR_003259	Cuerpo del gen	variante 9	-		
			NM_001077489	TSS1500	variante 7	Proteína GNAS isoforma g		
			NM_016592	3'UTR	variante 4	Proteína SCG6 (secretogranina VI)		
			NM_080426	TSS1500	variante 3	Proteína GNAS isoforma GNASS		
NM_080425	Cuerpo del gen	variante 2	Proteína GNAS isoforma XLas					
cg10748817	57465175	chr20: 57463652-57467739	NM_001077490	3'UTR	variante 2	Proteína ALEX isoforma Alex	0,01689	0,11538
			NM_000516	TSS1500	variante 1	Proteína GNAS isoforma GNASL		
			NR_003259	Cuerpo del gen	variante 9	-		
			NM_001077489	TSS1500	variante 7	Proteína GNAS isoforma g		
			NM_016592	3'UTR	variante 4	Proteína SCG6 (secretogranina VI)		
			NM_080426	TSS1500	variante 3	Proteína GNAS isoforma GNASS		
			NM_080425	Cuerpo del gen	variante 2	Proteína GNAS isoforma XLas		
cg25130962	57465511	chr20: 57463652-57467739	NM_001077490	3'UTR	variante 2	Proteína ALEX isoforma Alex	0,04035	-0,00875
			NM_000516	TSS1500	variante 1	Proteína GNAS isoforma GNASL		
			NM_001077488	TSS1500	variante 6	Proteína GNAS isoforma f		
			NR_003259	Cuerpo del gen	variante 9	-		
			NM_001077489	TSS1500	variante 7	Proteína GNAS isoforma g		
			NM_016592	3'UTR	variante 4	Proteína SCG6 (secretogranina VI)		
			NM_080426	TSS1500	variante 3	Proteína GNAS isoforma GNASS		
NM_080425	Cuerpo del gen	variante 2	Proteína GNAS isoforma XLas					

chr, cromosoma; UTR, región no traducida de los genes; TSS, Sitio de inicio de transcripción

ANEXO 8. Correlación entre los valores Log₂FC de los genes sobre- e infra-expresados entre las osificaciones (abdominal y escapular) de la Paciente1

Genes sobre-expresados	Log ₂ FC (OH abdominal vs. Control)	Log ₂ FC (OH escapular vs. Control)	Genes infra-expresados	Log ₂ FC (OH abdominal vs. Control)	Log ₂ FC (OH escapular vs. Control)
CACNA2D2	1,71	1,79	BMP5	-4,74	-5,82
CALML5	3,45	2,69	BMP7	-	-1,93
CDH1	4,87	3,95	BMP8A	-2,12	-1,68
CDKN2B	2,30	1,98	CACNA1C	-2,01	-1,83
CNTFR	1,75	1,98	CASP12	-	-1,50
COL3A1	1,66	1,60	CDC25B	-1,84	-
COMP	6,57	6,39	CDC7	-	-1,97
DKK1	1,84	-	CHAD	-	-1,58
DKK2	1,61	1,87	COL11A2	-1,86	-2,11
DTX1	-	1,53	DLL4	-2,04	-1,67
EFNA3	-	1,80	DUSP6	-1,64	-2,19
EGFR	1,64	1,52	DUSP8	-1,57	-
ERBB2	2,44	1,50	EPOR	-1,66	-
ETV1	1,93	1,50	ETS2	-	-1,54
ETV4	2,13	1,92	EYA1	-4,03	-5,11
FGFR2	1,98	-	FGFR3	-1,89	-1,75
FZD7	1,82	2,28	FLT1	-2,32	-1,62
HHIP	-	1,53	FN1	-1,55	-
HIST1H3G	1,86	1,94	FOS	-	-1,71
HSPA1A	2,65	3,12	FZD8	-1,90	-2,77
IGF1	1,59	1,95	GNG4	-1,90	-1,60
IL20RA	1,66	-	HHEX	-2,14	-1,86
IL20RB	2,06	-	HOXA11	-	-1,50
INHBA	1,95	1,77	ID1	-2,26	-
ITGB6	2,80	2,01	IL2RB	-	-2,28
ITGB8	3,95	3,33	ITGA8	-2,30	-1,92
LAMB3	2,60	1,87	JAG2	-	-1,77
LEP	-	2,23	LEF1	-2,54	-2,04
LIF	1,66	-	LEPR	-3,19	-2,94
MAP3K13	1,55	-	MAPK12	-	-1,54
MMP7	5,61	5,04	NGF	-	-2,14
MYB	1,85	-	NOG	-	-2,21
NR4A1	2,23	-	NOS3	-3,48	-3,43
PIK3R1	-	1,73	NOTCH1	-1,63	-2,02
PLA2GZA	1,56	3,77	PCK1	-1,60	-
PPARGC1A	5,30	4,41	PDGFB	-	-1,74
PRKAA2	2,24	2,09	PGF	-1,91	-1,53
PROM1	3,05	2,07	PIK3CD	-	-2,01
RELN	3,06	3,21	PLAT	-3,89	-3,09
RXRG	2,08	-	PRKAR1B	-1,57	-
SFN	4,63	3,78	RASA4	-1,65	-2,15
SFRP1	4,38	3,41	RASGRF2	-2,21	-3,29
SFRP2	3,71	5,54	SIX1	-	-2,14
SHC4	2,58	2,34	SOCS2	-1,75	-1,61
SOX9	3,68	2,75	SOX17	-	-1,99
TGFB3	1,57	1,62	TLR4	-2,16	-1,98
THBS4	-	3,15	TNFRSF10C	-1,51	-2,59
TMPPRSS2	4,82	3,93	TNN	-1,98	-
WEE1	2,00	1,68	TNR	-	-1,64
WNT11	1,63	-	VEGFC	-2,34	-2,01
			WIF1	-2,04	-2,53

Log₂FC, Logaritmo en base dos de la magnitud de cambio; OH, osificación heterotópica.

ANEXO 9. Análisis de enriquecimiento de genes infra- y sobre- expresados de muestras de osificación de la Paciente1 comparado con tejido óseo normal de paciente control sano

Expresión	Código GO	Descripción	P-valor ajustado	gen ID
sobre-regulada	GO:0071559	response to transforming growth factor beta	1,88x10 ⁻⁰⁷	PPARGC1A/SFRP1/ITGB8/SOX9/HSPA1A/ITGB6/CDKN2B/COL3A1/TGFB3
	GO:0001501	skeletal system development	2,07x10 ⁻⁰⁵	COMP/SFRP2/SFRP1/ITGB8/SOX9/ITGB6/IGF1/COL3A1/TGFB3
	GO:0060828	regulation of canonical Wnt signaling pathway	5,14x10 ⁻⁰⁴	SFRP2/SFRP1/SOX9/FZD7/DKK2/EGFR
	GO:0071772	response to BMP	5,16x10 ⁻⁰⁴	COMP/SFRP2/SFRP1/SOX9/TGFB3
	GO:0043405	regulation of MAP kinase activity	2,94x10 ⁻⁰³	SFRP2/SFRP1/IGF1/TGFB3/EGFR
	GO:0070371	ERK1 and ERK2 cascade	1,34x10 ⁻⁰²	SOX9/PLA2G2A/IGF1/EGFR
	GO:0060395	SMAD protein signal transduction	3,94x10 ⁻⁰³	ITGB6/INHBA/TGFB3
	GO:0014066	regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling	9,97x10 ⁻⁰³	SOX9/IGF1/EGFR
	GO:0110148	biomineralization	5,11x10 ⁻⁰⁴	COMP/SOX9/ITGB6/IGF1/TGFB3
	GO:0060350	endochondral bone morphogenesis	1,98x10 ⁻⁰²	COMP/SOX9
GO:0002062	chondrocyte differentiation	7,00x10 ⁻⁰³	COMP/SFRP2/SOX9	
infra-regulada	GO:0035924	cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus	6,08x10 ⁻⁰⁵	PGF/NOTCH1/DLL4/FLT1/VEGFC
	GO:0050678	regulation of epithelial cell proliferation	2,68x10 ⁻⁰⁴	PGF/NOTCH1/DLL4/FLT1/TLR4/VEGFC/BMP5
	GO:0050673	epithelial cell proliferation	4,67x10 ⁻⁰⁴	PGF/NOTCH1/DLL4/FLT1/TLR4/VEGFC/BMP5
	GO:0001935	endothelial cell proliferation	4,06x10 ⁻⁰³	PGF/DLL4/FLT1/VEGFC
	GO:0045747	positive regulation of Notch signaling pathway	3,12x10 ⁻⁰³	NOTCH1/DLL4/NOS3
	GO:0071772	response to BMP	3,22x10 ⁻⁰³	NOTCH1/BMP8A/LEF1/BMP5
	GO:0010632	regulation of epithelial cell migration	1,14x10 ⁻⁰²	NOTCH1/DLL4/VEGFC/NOS3
	GO:0060070	canonical Wnt signaling pathway	1,42x10 ⁻⁰²	NOTCH1/HHEX/LEF1/FZD8

GO, gene ontology.

ANEXO 10. Correlación entre los valores Log₂FC de los genes en la piel (zona rodilla y glúteo) de la Paciente1

Gen	Log ₂ FC (Piel rodilla vs. Control)	Log ₂ FC (Piel glúteo vs. Control)	Gen	Log ₂ FC (Piel rodilla vs. Control)	Log ₂ FC (Piel glúteo vs. Control)
IBSP	2,81	-3,55	AKT3	1,97	-
COMP	-	-3,10	ITGB3	1,97	-
FOS	-	-2,78	CAPN2	1,90	-
HSPA1A	-	-2,09	LEP	1,84	-
COL1A1	1,78	-2,06	COL1A2	1,81	-
COL1A2	1,81	-1,89	IRAK3	1,81	-
SOCS3	-	-1,88	COL1A1	1,78	-
JUN	-	-1,75	THBS1	1,77	-
MMP9	2,34	-1,62	CREB3L1	1,77	-
COL3A1	2,31	-1,51	SOCS1	1,74	-
HSPB1	-1,51	-1,50	TGFB3	1,72	-
COL2A1	-	2,43	GADD45G	1,72	-
PRKAR2B	3,80	2,02	BMP4	1,71	-
ZBTB16	4,53	-	IGF1	1,69	-
SFRP4	4,44	-	ETV1	1,68	-
PRKAR2B	3,80	-	ABL1	1,67	-
FGF2	3,34	-	MMP7	1,63	-
DDIT4	3,33	-	BMP8A	1,62	-
PIK3R1	3,24	-	RRAS2	1,60	-
LIFR	3,13	-	BAMBI	1,58	-
SPP1	2,83	-	DUSP4	1,58	-
IBSP	2,81	-	IL1R1	1,56	-
CDKN1C	2,81	-	PRKACB	1,55	-
PDGFRB	2,80	-	HSPB1	-1,51	-
HHIP	2,73	-	IL20RA	-1,56	-
PDGFD	2,54	-	HSPA2	-1,56	-
FST	2,53	-	DUSP5	-1,61	-
SOCS2	2,44	-	JAG2	-1,61	-
FN1	2,43	-	LAMC2	-1,70	-
GHR	2,41	-	CEBPA	-1,70	-
MMP9	2,34	-	WNT16	-1,73	-
COL3A1	2,31	-	WNT3	-1,77	-
FGFR1	2,23	-	HIST1H3G	-1,78	-
FGF7	2,19	-	ID1	-1,80	-
SFRP2	2,18	-	PRDM1	-1,81	-
CD14	2,17	-	HIST1H3B	-1,83	-
LTBP1	2,17	-	WNT4	-2,19	-
GADD45A	2,16	-	LAMB4	-2,30	-
COL5A2	2,15	-	BMP7	-2,55	-
PPARG	2,15	-	FGFR3	-2,58	-
ACVR1C	2,10	-	CDH1	-2,63	-
COL5A1	2,08	-	PIM1	-2,68	-
SFRP1	2,08	-	CALML5	-2,87	-
CHAD	2,05	-	IL20RB	-3,00	-
ANGPT1	2,02	-	SFN	-4,21	-
NTRK2	2,01	-			
ITGA9	2,00	-			

ANEXO 11. Análisis de enriquecimiento en términos GO en genes diferencialmente expresados entre piel de la rodilla de la Paciente1 vs piel sana de paciente control

Expresión	Código GO	Descripción	P-valor ajustado	genes
sobre-regulada	GO:0071900	regulation of protein serine/threonine kinase activity	6,59x10 ⁻¹³	PRKAR2B/FGF2/CDKN1C/PDGFRB/PDGFD/GHR/FGFR1/SFRP2/GADD45A/SFRP1/IRAK3/THBS1/GADD45G/TGFB3/BMP4/IGF1/ABL1/DUSP4
	GO:0001501	skeletal system development	9,47x10 ⁻¹⁴	ZBTB16/SFRP4/FGF2/HHIP/FST/MMP9/COL3A1/FGFR1/SFRP2/COL5A2/SFRP1/CHAD/LEP/COL1A2/COL1A1/TGFB3/BMP4/IGF1/BMP8A
	GO:0001503	ossification	4,78x10 ⁻¹³	ZBTB16/SPP1/MMP9/SFRP2/COL5A2/PPARG/SFRP1/LEP/COL1A2/COL1A1/CREB3L1/TGFB3/BMP4/IGF1/BMP8A/RRAS2/BAMBI
	GO:0043542	endothelial cell migration	3,34x10 ⁻⁰⁷	FGF2/FGFR1/GADD45A/PPARG/ANGPT1/AKT3/ITGB3/THBS1/BMP4/ABL1
	GO:0014065	phosphatidylinositol 3-kinase signaling	2,99x10 ⁻⁰⁹	FGF2/PIK3R1/PDGFRB/PDGFD/FN1/FGFR1/ANGPT1/NTRK2/LEP/IGF1
	GO:0001649	osteoblast differentiation	5,77x10 ⁻⁰⁸	SPP1/SFRP2/PPARG/SFRP1/COL1A1/CREB3L1/BMP4/IGF1/RRAS2/BAMBI
	GO:0071772	response to BMP	5,57x10 ⁻⁰⁹	SFRP4/FST/SFRP2/PPARG/SFRP1/TGFB3/BMP4/ABL1/BMP8A/BAMBI
	GO:0030509	BMP signaling pathway	2,99x10 ⁻⁰⁹	SFRP4/FST/SFRP2/PPARG/SFRP1/TGFB3/BMP4/ABL1/BMP8A/BAMBI
	GO:0043406	positive regulation of MAP kinase activity	6,99x10 ⁻⁰⁸	FGF2/PDGFRB/PDGFD/GHR/FGFR1/GADD45A/THBS1/GADD45G/TGFB3/IGF1
	GO:0010594	regulation of endothelial cell migration	7,13x10 ⁻⁰⁸	FGF2/FGFR1/GADD45A/PPARG/ANGPT1/AKT3/ITGB3/THBS1/BMP4/ABL1
	GO:0001958	endochondral ossification	1,17x10 ⁻⁰²	COL1A1/BMP4
	GO:0002062	chondrocyte differentiation	1,31x10 ⁻⁰²	ZBTB16/SFRP2/BMP4
	infra-regulada	GO:0045165	cell fate commitment	3,37x10 ⁻⁰³
GO:0008544		epidermis development	1,05x10 ⁻⁰²	JAG2/LAMC2/WNT16/CALML5/SFN
GO:0016331		morphogenesis of embryonic epithelium	3,37x10 ⁻⁰³	JAG2/WNT16/WNT4/BMP7
GO:0045667		regulation of osteoblast differentiation	1,85x10 ⁻⁰²	CEBPA/WNT4/BMP7
GO:0110148		biomineralization	2,42x10 ⁻⁰²	WNT4/BMP7/FGFR3
GO:0045444		fat cell differentiation	4,17x10 ⁻⁰²	CEBPA/BMP7/PIM1
GO:0007219		Notch signaling pathway	2,95x10 ⁻⁰²	JAG2/CEBPA/BMP7
GO:0031214		biomineral tissue development	2,39x10 ⁻⁰²	WNT4/BMP7/FGFR3
GO:0001837		epithelial to mesenchymal transition	2,21x10 ⁻⁰²	WNT16/WNT4/BMP7
GO:0030282		bone mineralization	1,51x10 ⁻⁰²	WNT4/BMP7/FGFR3

GO, *gene ontology*.

ANEXO 12. Análisis de enriquecimiento en términos GO en genes diferencialmente expresados entre piel del glúteo de la Paciente1 vs piel sana de paciente control

Expresión	Código GO	Descripción	P-valor ajustado	genes
Infra-regulado	GO:0071559	response to transforming growth factor beta	3,66x10 ⁻⁰⁷	COL3A1/JUN/COL1A2/COL1A1/HSPA1A/FOS
	GO:0001503	ossification	4,91x10 ⁻⁰⁵	MMP9/COL1A2/COL1A1/COMP/IBSP
	GO:0001501	skeletal system development	9,62x10 ⁻⁰⁵	COL3A1/MMP9/COL1A2/COL1A1/COMP
	GO:0030168	platelet activation	4,91x10 ⁻⁰⁵	COL3A1/COL1A2/COL1A1/COMP
	GO:0110148	biomineralization	4,91x10 ⁻⁰⁵	COL1A2/COL1A1/COMP/IBSP
	GO:0008637	apoptotic mitochondrial changes	5,58 x10 ⁻⁰⁴	MMP9/JUN/HSPA1A
	GO:0060350	endochondral bone morphogenesis	4,25x10 ⁻⁰³	COL1A1/COMP
	GO:0060349	bone morphogenesis	9,94x10 ⁻⁰³	COL1A1/COMP
	GO:0051216	cartilage development	2,80x10 ⁻⁰²	COL1A1/COMP
	GO:0001649	osteoblast differentiation	3,44x10 ⁻⁰²	COL1A1/IBSP

GO, *gene ontology*.

ANEXO 13. Genes diferencialmente expresados en el estudio comparativo exploratorio de transcriptoma completo mediante RNAseq entre la muestra de sangre periférica de la Paciente1 vs Paciente2

Código ENSEMBL	Símbolo HGNC	Código Entrez	HOP asymp mean	HOP severe mean	M	D	prob	ranking	Length	Chrom	Biotype
ENSG00000124102	PI3	5266	1140,94	18893,56	-4,05	17752,62	1,00	-17752,62	551	20	protein_coding
ENSG00000163737	PF4	5196	597,14	4547,64	-2,93	3950,49	0,99	-3950,49	773	4	protein_coding
ENSG00000211649	IGLV7-46	-	324,34	3432,90	-3,40	3108,56	1,00	-3108,56	385	22	IG_V_gene
ENSG00000100985	MMP9	4318	311,51	3088,12	-3,31	2776,61	1,00	-2776,61	2336	20	protein_coding
ENSG00000240671	IGKV1-8	-	251,00	2489,83	-3,31	2238,83	1,00	-2238,84	398	2	IG_V_gene
ENSG00000154146	NRGN	4900	158,32	2051,68	-3,70	1893,35	1,00	-1893,36	1213	11	protein_coding
ENSG00000239839	DEFA3	1668	50,56	1871,12	-5,21	1820,57	1,00	-1820,57	494	8	protein_coding
ENSG00000158825	CDA	978	217,40	1862,77	-3,10	1645,37	0,99	-1645,38	820	1	protein_coding
ENSG00000176788	BASP1	10409	244,39	1853,17	-2,92	1608,78	0,99	-1608,78	2146	5	protein_coding
ENSG00000169704	GP9	-	122,75	1294,07	-3,40	1171,32	1,00	-1171,33	877	3	protein_coding
ENSG00000198695	MT-ND6	4541	75,46	711,51	-3,24	636,05	1,00	-636,06	525	MT	protein_coding
ENSG00000101162	TUBB1	81027	56,79	675,59	-3,57	618,80	1,00	-618,81	3321	20	protein_coding
ENSG00000229314	ORM1	5004	64,86	653,39	-3,33	588,53	1,00	-588,54	863	9	protein_coding
ENSG00000236304	-	-	47,11	469,67	-3,32	422,57	1,00	-422,58	1426	11	lncRNA
ENSG00000161911	TREML1	340205	31,36	438,79	-3,81	407,43	1,00	-407,45	1483	6	protein_coding
ENSG00000278828	H3C10	8357	52,21	394,30	-2,92	342,08	0,99	-342,09	1237	6	protein_coding
ENSG00000133048	CHI3L1	1116	26,63	334,99	-3,65	308,36	1,00	-308,38	3363	1	protein_coding
ENSG00000230257	NFE4	-	43,38	320,71	-2,89	277,33	0,99	-277,34	1072	7	lncRNA
ENSG00000101335	MYL9	10398	11,35	273,26	-4,59	261,91	1,00	-261,95	2808	20	protein_coding
ENSG00000164821	DEFA4	1669	4,40	202,66	-5,53	198,26	1,00	-198,34	587	8	protein_coding
ENSG00000167434	CA4	762	23,51	195,32	-3,05	171,81	0,99	-171,84	2418	17	protein_coding
ENSG00000173825	TIGD3	220359	13,59	182,43	-3,75	168,84	1,00	-168,88	2028	11	protein_coding
ENSG00000135929	CYP27A1	1593	11,26	159,92	-3,83	148,66	1,00	-148,71	2983	2	protein_coding
ENSG00000204710	SPDYC	387778	1,74	145,25	-6,38	143,51	1,00	-143,66	991	11	protein_coding
ENSG00000232187	FTTH1P7	-	14,04	148,70	-3,40	134,66	1,00	-134,70	552	13	processed_pseudogene
ENSG00000253616	-	-	19,55	148,53	-2,93	128,98	0,99	-129,02	881	8	lncRNA
ENSG00000111644	ACRBP	-	13,76	110,68	-3,01	96,92	0,99	-96,97	2816	12	protein_coding
ENSG00000000561	ITGA2B	3674	4,54	101,10	-4,48	96,57	1,00	-96,67	5695	17	protein_coding
ENSG00000233614	DDX11L10	727856	3,50	96,66	-4,79	93,16	1,00	-93,29	1723	16	transcribed_unprocessed_pseudogene
ENSG00000167173	C15orf39	-	12,90	103,04	-3,00	90,14	0,99	-90,19	5807	15	protein_coding
ENSG00000249992	TMEM158	25907	3,31	90,76	-4,78	87,45	1,00	-87,58	1822	3	protein_coding
ENSG00000004939	SLC4A1	6521	9,58	93,78	-3,29	84,20	0,99	-84,26	5125	17	protein_coding
ENSG00000173868	PHOSPHO1	162466	10,80	91,51	-3,08	80,71	0,99	-80,77	2392	17	protein_coding
ENSG00000225936	SLC18A2-AS1	-	10,42	89,54	-3,10	79,12	0,99	-79,18	744	10	lncRNA
ENSG00000162366	PDZK1IP1	10158	6,62	79,86	-3,59	73,24	1,00	-73,33	1430	1	protein_coding
ENSG00000163751	CPA3	-	0,95	59,64	-5,97	58,70	1,00	-59,00	1815	3	protein_coding
ENSG00000282416	-	-	1,14	56,57	-5,64	55,44	1,00	-55,72	757	19	processed_pseudogene
ENSG00000158856	DMTN	2039	7,12	60,64	-3,09	53,51	0,99	-53,60	4473	8	protein_coding
ENSG00000225972	MTND1P23	-	2,31	54,36	-4,55	52,05	1,00	-52,25	372	1	unprocessed_pseudogene
ENSG00000226564	FTTH1P20	-	4,71	47,76	-3,34	43,04	0,99	-43,17	548	2	processed_pseudogene
ENSG00000224805	LINC00853	100874253	0,43	39,59	-6,52	39,16	1,00	-39,70	661	1	lncRNA
ENSG00000120885	CLU	1191	4,25	40,32	-3,25	36,07	0,99	-36,21	6285	8	protein_coding
ENSG00000103355	PRSS33	260429	4,02	39,47	-3,29	35,44	0,99	-35,60	2140	16	protein_coding
ENSG00000172232	AZU1	566	0,48	33,38	-6,11	32,90	0,99	-33,46	1782	19	protein_coding
ENSG00000262332	-	-	0,43	30,73	-6,16	30,30	0,99	-30,92	542	16	lncRNA

MARÍA JOSÉ CURRÁS TUALA

Código ENSEMBL	Símbolo HGNC	Código Entrez	HOP asymp mean	HOP severe mean	M	D	prob	ranking	Length	Chrom	Biotype
ENSG00000243650	RN7SL834P	-	3,01	33,28	-3,47	30,26	0,99	-30,46	286	2	misc_RNA
ENSG00000256720	BTG1P1	-	1,70	30,44	-4,17	28,75	0,99	-29,05	508	12	processed_pseudogene
ENSG00000228278	ORM2	5005	1,13	29,78	-4,71	28,65	0,99	-29,03	759	9	protein_coding
ENSG00000236017	ASMTL-AS1	-	2,58	31,19	-3,60	28,61	0,99	-28,83	1335	X	lncRNA
ENSG00000275494	-	-	1,61	28,96	-4,17	27,35	0,99	-27,66	534	16	lncRNA
ENSG00000205309	NT5M	56953	2,20	29,12	-3,73	26,92	0,99	-27,18	1961	17	protein_coding
ENSG00000272555	-	-	1,89	28,76	-3,93	26,87	0,99	-27,15	455	2	lncRNA
ENSG00000206047	DEFA1	1667	0,43	26,28	-5,93	25,85	0,99	-26,52	498	8	protein_coding
ENSG00000285618	-	-	0,43	25,97	-5,91	25,54	0,99	-26,22	687	5	lncRNA
ENSG00000278158	-	-	0,43	25,31	-5,88	24,88	0,99	-25,57	235	21	lncRNA
ENSG00000233214	-	-	1,91	26,44	-3,79	24,52	0,99	-24,81	450	19	lncRNA
ENSG00000254030	IGLC5	-	0,43	24,36	-5,82	23,93	0,99	-24,63	293	22	IG_C_pseudogene
ENSG00000207445	SNORD15B	114599	23,59	0,59	5,31	23,00	0,99	23,60	146	11	snoRNA
ENSG00000163376	KBTBD8	84541	25,28	1,76	3,85	23,52	0,99	23,83	4736	3	protein_coding
ENSG00000146476	ARMT1	79624	27,19	2,11	3,69	25,08	0,99	25,35	2819	6	protein_coding
ENSG00000239002	SCARNA10	692148	26,10	0,59	5,46	25,50	0,99	26,08	330	12	snoRNA
ENSG00000272343	-	-	28,35	2,45	3,53	25,90	0,99	26,14	486	8	lncRNA
ENSG00000104147	OIP5	11339	28,68	1,98	3,86	26,70	0,99	26,98	1201	15	protein_coding
ENSG00000169288	MRPL1	65008	30,68	2,19	3,81	28,49	0,99	28,74	1628	4	protein_coding
ENSG00000272917	-	-	30,81	1,93	3,99	28,87	0,99	29,15	615	12	lncRNA
ENSG00000122481	RWDD3	25950	32,18	3,09	3,38	29,09	0,99	29,29	1927	1	protein_coding
ENSG00000270006	C16orf95-DT	101928659	30,07	0,59	5,66	29,47	0,99	30,01	401	16	lncRNA
ENSG00000113387	SUB1	10923	32,71	2,82	3,53	29,89	0,99	30,10	9266	5	protein_coding
ENSG00000141429	GALNT1	2589	33,94	3,48	3,29	30,46	0,99	30,63	5126	18	protein_coding
ENSG00000270062	-	-	32,99	2,40	3,78	30,59	0,99	30,82	496	14	lncRNA
ENSG00000273271	-	-	33,12	2,29	3,86	30,83	0,99	31,07	520	21	lncRNA
ENSG00000206838	SNORA5A	654319	32,13	0,59	5,76	31,54	0,99	32,06	134	7	snoRNA
ENSG00000256948	-	-	32,33	0,59	5,76	31,74	0,99	32,26	586	12	lncRNA
ENSG00000226221	RPL26P19	-	35,39	2,72	3,70	32,67	0,99	32,88	438	5	processed_pseudogene
ENSG00000167005	NUDT21	-	36,89	3,61	3,35	33,28	0,99	33,44	5930	16	protein_coding
ENSG00000143942	CHAC2	494143	36,18	2,73	3,73	33,46	0,99	33,66	1309	2	protein_coding
ENSG00000031691	CENPQ	55166	36,60	2,05	4,16	34,55	0,99	34,80	1741	6	protein_coding
ENSG00000175324	LSM1	-	38,54	3,55	3,44	34,99	0,99	35,16	1676	8	protein_coding
ENSG00000226084	-	-	35,69	0,59	5,91	35,09	1,00	35,59	555	1	processed_pseudogene
ENSG00000166266	CUL5	8065	40,29	4,53	3,15	35,76	0,99	35,90	6562	11	protein_coding
ENSG00000143933	CALM2	805	41,16	4,68	3,14	36,48	0,99	36,61	7114	2	protein_coding
ENSG00000252010	SCARNA5	677775	37,44	0,59	5,98	36,85	1,00	37,33	276	2	scaRNA
ENSG00000243964	RPL23AP65	-	42,32	2,54	4,06	39,78	1,00	39,99	468	11	processed_pseudogene
ENSG00000111537	IFNG	3458	43,38	2,95	3,88	40,43	1,00	40,62	1211	12	protein_coding
ENSG00000163584	RPL22L1	200916	41,99	1,16	5,18	40,83	1,00	41,16	2051	3	protein_coding
ENSG00000253251	SHLD3	112441434	42,09	0,59	6,15	41,50	1,00	41,95	1739	5	protein_coding
ENSG00000164031	DNAJB14	79982	46,28	4,31	3,42	41,97	0,99	42,11	12970	4	protein_coding
ENSG00000109475	RPL34	6164	47,17	5,09	3,21	42,08	0,99	42,21	3505	4	protein_coding
ENSG00000111711	GOLT1B	51026	48,41	5,34	3,18	43,07	0,99	43,19	3789	12	protein_coding
ENSG00000165997	ARL5B	221079	48,88	5,64	3,12	43,24	0,99	43,36	7170	10	protein_coding
ENSG00000211813	TRAV34	-	46,88	0,59	6,30	46,29	1,00	46,72	349	14	TR_V_gene
ENSG00000225964	NRIR	-	54,20	4,76	3,51	49,44	0,99	49,56	2749	2	lncRNA
ENSG00000179387	ELMOD2	255520	57,00	5,93	3,26	51,07	0,99	51,18	6617	4	protein_coding
ENSG00000235363	SNRPGP10	-	53,58	0,59	6,49	52,99	1,00	53,39	225	1	processed_pseudogene

Código ENSEMBL	Símbolo HGNC	Código Entrez	HOP asymp mean	HOP severe mean	M	D	prob	ranking	Length	Chrom	Biotype
ENSG00000146247	PHIP	55023	62,37	6,47	3,27	55,91	0,99	56,00	14718	6	protein_coding
ENSG00000136522	MRPL47	57129	63,72	5,23	3,61	58,49	1,00	58,60	1365	3	protein_coding
ENSG00000132485	ZRANB2	9406	67,20	7,16	3,23	60,04	0,99	60,13	4985	1	protein_coding
ENSG00000038210	PI4K2B	55300	70,81	8,39	3,08	62,42	0,99	62,49	3685	4	protein_coding
ENSG00000214389	RPS3AP26	-	65,91	3,03	4,44	62,87	1,00	63,03	784	7	processed_pseudogene
ENSG00000169245	CXCL10	3627	66,70	1,01	6,04	65,68	1,00	65,96	1175	4	protein_coding
ENSG00000110848	CD69	969	69,64	3,78	4,20	65,86	1,00	65,99	2832	12	protein_coding
ENSG00000139163	ETNK1	55500	73,55	6,08	3,60	67,47	1,00	67,56	13301	12	protein_coding
ENSG00000166479	TMX3	54495	93,78	9,42	3,31	84,36	0,99	84,43	7447	18	protein_coding
ENSG00000150045	KLRF1	51348	95,00	8,50	3,48	86,51	1,00	86,58	1260	12	protein_coding
ENSG00000214485	RPL7P1	-	92,23	4,78	4,27	87,45	1,00	87,55	747	5	processed_pseudogene
ENSG00000126860	EVI2A	2123	115,25	11,18	3,37	104,07	1,00	104,13	3086	17	protein_coding
ENSG00000170860	LSM3	-	120,50	15,23	2,98	105,27	0,99	105,31	3359	3	protein_coding
ENSG00000133106	EPST11	94240	123,65	15,70	2,98	107,95	0,99	107,99	4924	13	protein_coding
ENSG00000169019	COMMD8	54951	119,04	8,12	3,87	110,92	1,00	110,98	1758	4	protein_coding
ENSG00000234287	-	-	124,96	14,00	3,16	110,96	0,99	111,00	255	3	processed_pseudogene
ENSG00000185745	IFIT1	-	126,55	13,92	3,18	112,62	0,99	112,67	4614	10	protein_coding
ENSG00000244716	-	-	150,51	10,72	3,81	139,80	1,00	139,85	555	1	processed_pseudogene
ENSG00000127184	COX7C	1350	163,14	17,52	3,22	145,62	0,99	145,65	1969	5	protein_coding
ENSG00000227671	ZNF731P	-	178,22	22,58	2,98	155,64	0,99	155,66	2160	1	transcribed_unprocessed_pseudogene
ENSG00000147669	POLR2K	5440	170,38	7,82	4,45	162,56	1,00	162,62	1673	8	protein_coding
ENSG00000165949	IFI27	3429	165,92	2,58	6,01	163,34	1,00	163,45	4147	14	protein_coding
ENSG00000259865	-	-	206,66	23,87	3,11	182,79	0,99	182,81	1246	1	lncRNA
ENSG00000165512	ZNF22	-	228,09	22,06	3,37	206,03	1,00	206,06	2103	10	protein_coding
ENSG00000137965	IFI44	10561	215,08	5,25	5,36	209,83	1,00	209,90	2038	1	protein_coding
ENSG00000265681	RPL17	6139	240,68	28,15	3,10	212,53	0,99	212,55	2451	18	protein_coding
ENSG00000137970	RPL7P9	-	268,61	28,67	3,23	239,95	0,99	239,97	747	1	processed_pseudogene
ENSG00000137959	IFI44L	10964	247,89	3,28	6,24	244,62	1,00	244,70	11610	1	protein_coding
ENSG00000189043	NDUFA4	-	292,87	35,75	3,03	257,12	0,99	257,14	3461	7	protein_coding
ENSG00000236439	-	-	308,53	28,10	3,46	280,43	1,00	280,45	254	1	processed_pseudogene
ENSG00000147604	RPL7	6129	340,64	32,60	3,39	308,04	1,00	308,06	2700	8	protein_coding
ENSG00000154589	LY96	23643	380,52	21,28	4,16	359,24	1,00	359,26	559	8	protein_coding
ENSG00000123975	CKS2	1164	419,41	42,49	3,30	376,92	1,00	376,93	616	9	protein_coding
ENSG00000234797	RPS3AP6	-	744,19	31,42	4,57	712,76	1,00	712,78	795	15	processed_pseudogene
ENSG00000237550	-	-	980,09	59,73	4,04	920,36	1,00	920,37	717	15	transcribed_processed_pseudogene
ENSG00000198918	RPL39	6170	2206,37	262,74	3,07	1943,62	0,99	1943,62	2128	X	protein_coding

ANEXO 14. Clasificación de los genes/transcritos en biotipos¹ (ENSEMBL)

Biotype	Description
IG gene:	<i>Immunoglobulin gene that undergoes somatic recombination, annotated in collaboration with IMGT</i>
IG C gene:	<i>Constant chain immunoglobulin gene that undergoes somatic recombination before transcription</i>
IG D gene:	<i>Diversity chain immunoglobulin gene that undergoes somatic recombination before transcription</i>
IG J gene:	<i>Joining chain immunoglobulin gene that undergoes somatic recombination before transcription</i>
IG V gene:	<i>Variable chain immunoglobulin gene that undergoes somatic recombination before transcription</i>
Nonsense Mediated Decay:	<i>A transcript with a premature stop codon considered likely to be subjected to targeted degradation. Nonsense-Mediated Decay is predicted to be triggered where the in-frame termination codon is found more than 50bp upstream of the final splice junction</i>
Processed transcript:	<i>Gene/transcript that doesn't contain an open reading frame (ORF)</i>
Long non-coding RNA (lncRNA):	<i>A non-coding gene/transcript >200bp in length</i>
3' overlapping ncRNA:	<i>Transcripts where data and/or published experimental data strongly supports the existence of long (>200bp) non-coding transcripts that overlap the 3'UTR of a protein-coding locus on the same strand</i>
Antisense:	<i>Transcripts that overlap the genomic span (i.e. exon or introns) of a protein-coding locus on the opposite strand</i>
Macro lncRNA:	<i>Unspliced lncRNAs that are several kb in size</i>
Non coding:	<i>Transcripts which are known from the literature to not be protein coding</i>
Retained intron:	<i>An alternatively spliced transcript believed to contain intronic sequence relative to other, coding, transcripts of the same gene</i>
Sense intronic:	<i>A long non-coding transcript in introns of a coding gene that does not overlap any exons</i>
Sense overlapping:	<i>A long non-coding transcript that contains a coding gene in its intron on the same strand</i>
lincRNA (long intergenic ncRNA):	<i>Transcripts that are long intergenic non-coding RNA locus with a length >200bp. Requires lack of coding potential and may not be conserved between species</i>
ncRNA:	<i>A non-coding gene</i>
miRNA:	<i>A small RNA (~22bp) that silences the expression of target mRNA</i>
miscRNA:	<i>Miscellaneous RNA. A non-coding RNA that cannot be classified</i>
piRNA:	<i>An RNA that interacts with piwi proteins involved in genetic silencing</i>
rRNA:	<i>The RNA component of a ribosome</i>
siRNA:	<i>A small RNA (20-25bp) that silences the expression of target mRNA through the RNAi pathway</i>
snRNA:	<i>Small RNA molecules that are found in the cell nucleus and are involved in the processing of pre messenger RNAs</i>
snoRNA:	<i>Small RNA molecules that are found in the cell nucleolus and are involved in the post-transcriptional modification of other RNAs</i>
tRNA:	<i>A transfer RNA, which acts as an adaptor molecule for translation of mRNA</i>
vaultRNA:	<i>Short non coding RNA genes that form part of the vault ribonucleoprotein complex</i>
Protein coding:	<i>Gene/transcript that contains an open reading frame (ORF)</i>
Pseudogene:	<i>A gene that has homology to known protein-coding genes but contain a frameshift and/or stop codon(s) which disrupts the ORF. Thought to have arisen through duplication followed by loss of function</i>
IG pseudogene:	<i>Inactivated immunoglobulin gene</i>
Polymorphic pseudogene:	<i>Pseudogene owing to a SNP/indel but in other individuals/haplotypes/strains the gene is translated</i>
Processed pseudogene:	<i>Pseudogene that lack introns and is thought to arise from reverse transcription of mRNA followed by reinsertion of DNA into the genome</i>
Transcribed pseudogene:	<i>Pseudogene where protein homology or genomic structure indicates a pseudogene, but the presence of locus-specific transcripts indicates expression. These can be classified into 'Processed', 'Unprocessed' and 'Unitary'</i>
Translated pseudogene:	<i>Pseudogenes that have mass spec data suggesting that they are also translated. These can be classified into 'Processed', 'Unprocessed'</i>
Unitary pseudogene:	<i>A species specific unprocessed pseudogene without a parent gene, as it has an active orthologue in another species</i>
Unprocessed pseudogene:	<i>Pseudogene that can contain introns since produced by gene duplication</i>
Readthrough:	<i>A readthrough transcript has exons that overlap exons from transcripts belonging to two or more different loci (in addition to the locus to which the readthrough transcript itself belongs)</i>
Stop codon readthrough:	<i>The coding sequence contains a stop codon that is translated (as supported by experimental evidence), and termination occurs instead at a canonical stop codon further downstream. It is currently unknown which codon is used to replace the translated stop codon, hence it is represented by 'X' in the protein sequence</i>

Biotype	Description
TEC	<i>(To be Experimentally Confirmed): Regions with EST clusters that have polyA features that could indicate the presence of protein coding genes. These require experimental validation, either by 5' RACE or RT-PCR to extend the transcripts, or by confirming expression of the putatively-encoded peptide with specific antibodies</i>
TR gene:	<i>T cell receptor gene that undergoes somatic recombination, annotated in collaboration with IMGT</i>
TR C gene:	<i>Constant chain T cell receptor gene that undergoes somatic recombination before transcription</i>
TR D gene:	<i>Diversity chain T cell receptor gene that undergoes somatic recombination before transcription</i>
TR J gene:	<i>Joining chain T cell receptor gene that undergoes somatic recombination before transcription</i>
TR V gene:	<i>Variable chain T cell receptor gene that undergoes somatic recombination before transcription</i>

¹ Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, et al., **Ensembl 2022**. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7; 50 (D1):D988-D995. doi: 10.1093/nar/gkab1049.

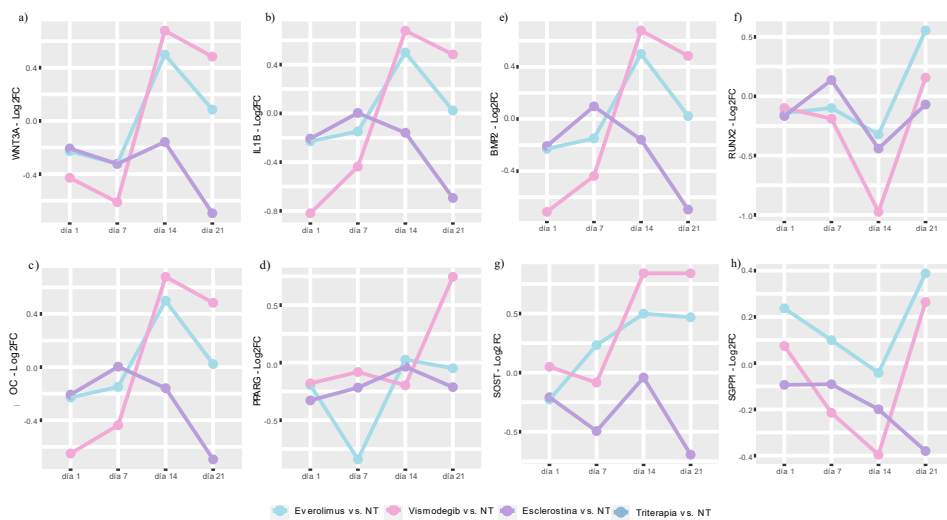
ANEXO 15. Proteínas identificadas por análisis cualitativo de la Paciente1, Paciente2, Grupo HOP y Controles

	Nombre de la Proteína	Nombre UniProt	UniProt ID	Gen	Masa (kDa)	Función
Paciente 1	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 3-23	HV323	P01764	IGHV3-23	12	Unión al antígeno
	Inmunoglobulina kappa variable 1-17	KV117	P01599	IGKV1-17	12	Unión al antígeno
	Receptor 2 de Rianodina	RYR2	Q92736	RYR2	564	Modulación del canal de calcio
	Complemento C1q subcomponente subunidad A	C1QA	P02745	C1QA	26	Unión beta-amiloide
	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 1-24	HV124	A0A0C4DH33	IGHV1-24	12	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Inmunoglobulina kappa variable 6-21	KV621	A0A0C4DH24	IGKV6-21	12	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Subunidad 5 del complejo de Golgi oligomérico conservado	COG5	Q9UP83	COG5	92	Proteína de transporte
	Proteína de anclaje A-quinasa 1, mitocondrial	AKAP1	Q92667	AKAP1	97	Unión a ARN
	ADP-factor de ribosilación proteína activadora de GTPasa 2	ARFG2	Q8N6H7	ARFGAP2	56	Activación de la GTPasa
	Quinasa 1B asociada a Golgi	GAK1B	Q6UWH4	GASK1B	56	Membrana del aparato de Golgi
	Proteína de unión 5 UL-16	ULBP5	Q6H3X3	RAET1G	37	Unión al receptor similar a la lectina de las células natural killer
	HAUS augmin similar al complejo subunidad 3	HAUS3	Q68CZ6	HAUS3	69	División celular
	Proteína transmembranal 198	TM198	Q66K66	TMEM198	69	Regulación positiva de la vía de señalización canónica-Wnt
	Receptor de glutamato ionotrópico, kainato 4	GRIK4	Q16099	GRIK4	107	Actividad del receptor glutamato
	Cinasa de cadena ligera de miosina, músculo liso	MYLK	Q15746	MYLK	210	Unión a actina, unión a calmodulina, Cinasa, Serina/Treonina-proteína cinasa, Transferasa
	Proteína del complejo de poros nucleares Nup98-Nup96	NUP98	P52948	NUP98	197	Unión al mRNA
	Serina proteasa 1 de lectina de unión a la manosa	MASP1	P48740	MASP1	79	Unión a proteínas dependientes de calcio
	Factor de transcripción de pendiente de AMP cíclico ATF-3	ATF3	P18847	ATF3	20	Activadora de la transcripción de unión al ADN, específica de la ARN polimerasa II
	Plastina-2	PLSL	P13796	LCP1	70	Unión a actina
	Cadena beta del componente C8 del complemento	CO8B	P07358	C8B	67	Activación del complemento
	Proteína 6 de unión a GTPasa Ran	RNBP6	O60518	RANBP6	124	Actividad del receptor de señalización de importación nuclear
	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 2-70D	HV70D	A0A0C4DH43	IGHV2-70D	13	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 1-69D	HV69D	A0A0B4J2H0	IGHV1-69D	12	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Proteína de anclaje relacionada con nebulina	NRAP	Q86VF7	NRAP	197	Unión a actina
	Proteína cinasa 7 activada por mitógeno de doble especificidad	MP2K7	O14733	MAP2K7	47	Cinasa, Serina/Treonina-protein Cinasa, Transferasa, Tirosina-proteína cinasa
	Proteína putativa no caracterizada codificada por LINC00472	CF155	Q9H8W2	LINC00472	13	
	Componente P amiloide sérico	SAMP	P02743	APCS	25	Unión al calcio
	Receptor 4 de efrina tipo B	EPHB4	P54760	EPHB4	108	Proteína de desarrollo, Receptor cinasa, Transferasa, Tirosina-proteína cinasa
	Proteína putativa no caracterizada codificada por FLJ42213	YS045	Q6ZVQ6			
	Proteína 11 que interactúa con el receptor tiroideo	TRIPB	Q15643	TRIP11	227	Actividad coactivadora de la transcripción
	Proteína 2 citosólica de linfocitos	LCP2	Q13094	LCP2	60	Señalización mediada por receptor de antígeno de células T.

	Nombre de la Proteína	Nombre UniProt	UniProt ID	Gen	Masa (kDa)	Función
	Rap guanine nucleotide exchange factor 6	RPGF6	Q8TEU7	RAPGEF6	179	Factor liberador de nucleótidos de guanina
	Cadena beta de la proteína de unión a C4b	C4BPB	P20851	C4BPB	28	Controla la vía clásica de activación del complemento
	Similar a la proteína de unión a sintaxina 5	STB5L	Q9Y2K9	STXBP5L	131	Activador de GTPasa
Paciente 2	Inmunoglobulina lambda variable 7-46	LV746	A0A075B6I9	IGLV7-46	12	Unión a antígeno
	Adiponectina	ADIPO	Q15848	ADIPOQ	26	Hormona
	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 3-9	HV309	P01782	IGHV3-9	13	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Aminopeptidasa N	AMPN	P15144	ANPEP	109	Aminopeptidasa, Proteína de desarrollo, Receptor de células huésped para la entrada de virus, Hidrolasa, Metaloproteasa, Proteasa, Receptor
	Factor X de la coagulación	FA10	P00742	F10	54	Hidrolasa, proteasa, serina proteasa
	Inmunoglobulina cadena pesada variable 3-74	HV374	A0A0B4J1X5	IGHV3-74	13	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Inmunoglobulina cadena pesada 4-59	HV459	P01825	IGHV4-59	13	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Inmunoglobulina cadena pesada 3-13	HV313	P01766	IGHV3-13	12	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Inmunoglobulina cadena pesada 3-73	HV373	A0A0B4J1V6	IGHV3-73	13	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Proteína de motivo de unión a ARN, ligada a X 2	RBMX2	Q9Y388	RBMX2	37	Unión al ARN
	Proteína transmembrana 2 relacionada con tioredoxina	TMX2	Q9Y320	TMX2	34	Homeostasis redox ceular
	Ornitina descarboxilasa antizima 3	OAZ3	Q9UMX2	OAZ3	27	Actividad inhibidora de la ornitina descarboxilasa
	Proteína asociada y localizador de BRCA2	PALB2	Q86YC2	PALB2	131	Unión al ADN
	Subunidad catalítica PAN del complejo de deadenilación PAN2-PAN3	PAN2	Q504Q3	PAN2	135	Exonucleasa, Hidrolasa, Nucleasa
	Apolipoproteína F	APOF	Q13790	APOF	35	Unión al colesterol
	Complemento C9 del complemento	CO9	P02748	C9	63	Vía alternativa del complemento, muerte celular
	Ficolina-2	FCN2	Q15485	FCN2	34	Unión a antígenos, unión a proteínas dependientes de calcio
	Ficolina-3	FCN3	Q75636	FCN3	33	Unión a antígeno
	Inmunoglobulina kappa variable 1D-16	KVD16	P01601	IGKV1D-16	13	Unión a antígeno
	Inmunoglobulina lambda similar al polipéptide 1	IGLL1	P15814	IGLL1	23	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Plastina-3	PLST	P13797	PLS3	69	Unión de filamentos de actina, unión de iones de calcio
	Inmunoglobulina kappa variable 3D-15	KVD15	A0A087WSY6	IGKV3D-15	12	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
Comúnes HOP	Complemento C5	CO5	P01031	C5	188	Actividad de quimiocinas, actividad inhibidora de endoepitidasa, unión al receptor de señalización
	Inmunoglobulina kappa variable 1-6	KV106	A0A0C4DH72	IGKV1-6	12	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 1-8	HV108	P0DP01	IGHV1-8	13	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Inmunoglobulina kappa variable 1D-8	KVD08	A0A087WSZ0	IGKV1D-8	13	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Inmunoglobulina lambda variable 2-8	KVD08	P01709	IGLV2-8	13	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Inmunoglobulina de cadena pesada variable 2-26	HV226	A0A0B4J1V2	IGHV2-26	13	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Inmunoglobulina lambda variable 1-36	LV136	A0A0B4J1U3	IGLV1-36	12	Unión a antígeno, unión a receptor de inmunoglobulina
	Apolipoproteína C-II	APOC2	P02655	APOC2	11	Actividad inhibidora de la Lipasa
Controles	Inmunoglobulina kappa variable 1D-39	KVD39	P04432	IGKV1D-39	11	Unión al antígeno
	Inmunoglobulina cadena pesada variable 3-30-3	HVC33	P0DP02	IGHV3-30-3	11	Unión al antígeno
	Inmunoglobulina lambda variable 3-27	LV327	P01718	IGLV3-27	10	Unión al antígeno
	Inmunoglobulina lambda variable 9-49	LV949	A0A0B4J1Y8	IGLV9-49	11	Respuesta inmune adaptativa
	Proteína dedo de zinc que interactua con Cip1	CIZ1	Q9ULV3	CIZ1	10	Unión a ácido nucléico
	Proteína C-reactiva	CRP	P02741	CRP	23	Unión al calcio
	Inmunoglobulina de cadena pesada constante delta	IGHD	P01880	IGHD	42	Unión al antígeno

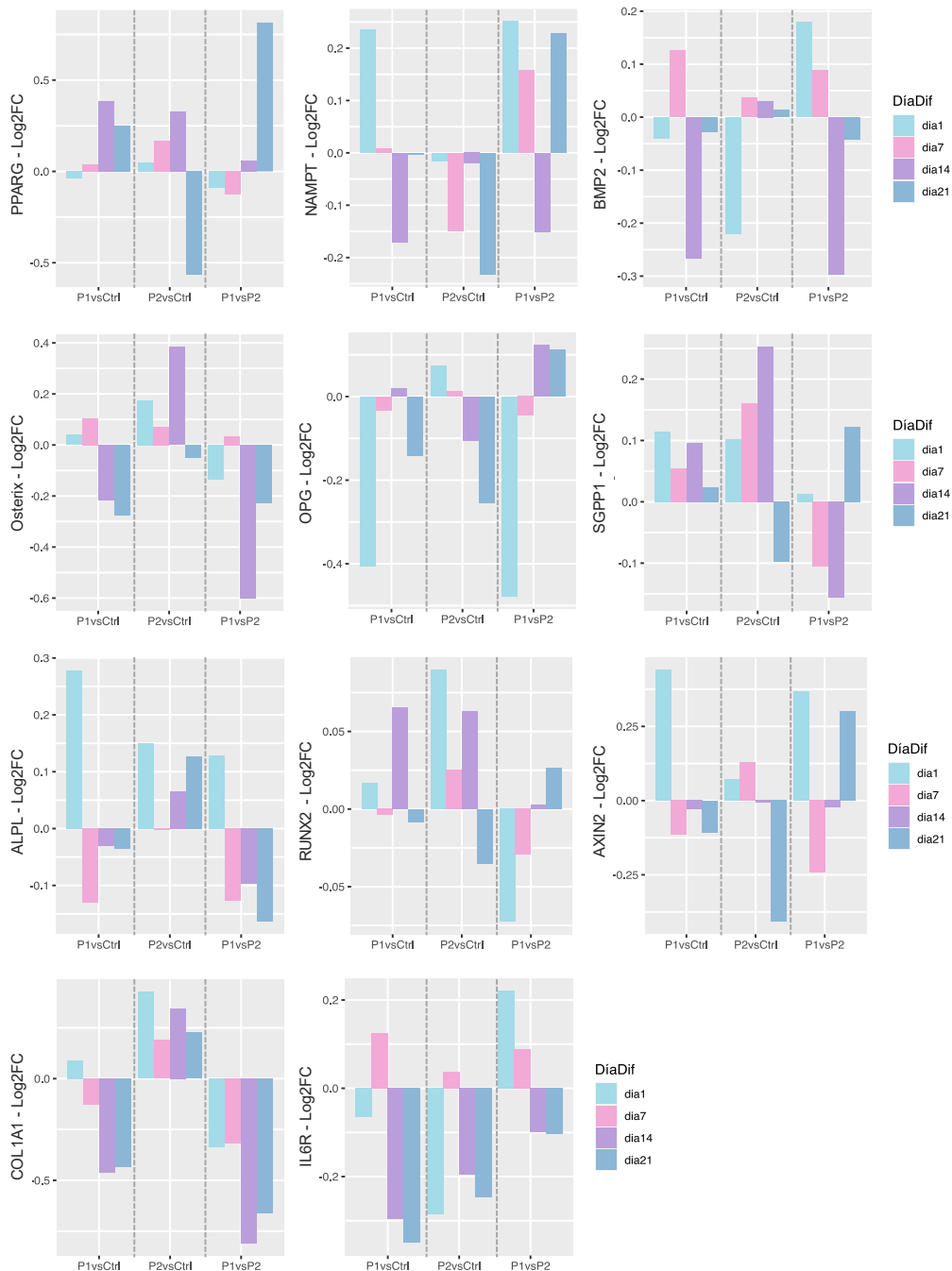
Nombre de la Proteína	Nombre UniProt	UniProt ID	Gen	Masa (kDa)	Función
Queratina 14 del citoesqueleto tipo I	K1C14	P02533	KRT14	51	Unión al filamento de queratina
Trombospondina-2	TSP2	P35442	THBS2	127	Unión al calcio
Immunoglobulina lambda variable 4-60	LV460	A0A075B611	IGLV4-60	11	Respuesta inmune adaptativa
Miembro 1 de la familia 12 de transportadores de soluto	S12A1	Q13621	SLC12A1	12	Actividad del simportador de potasio:cloruro
Microtúbulo-asociado a la proteína tau	TAU	P10636	MAPT	78	Unión a actina
Immunoglobulina lambda variable 1-40	LV140	P01703	IGLV1-40	10	Unión al antígeno
Immunoglobulina de cadena pesada variable 3-66	HV366	A0A0C4DH42	IGHV3-66	10	Unión al antígeno
Immunoglobulina kappa variable 1-5	KV105	P01602	IGKV1-5	10	Unión al antígeno
Fibrinógeno de cadena beta	FIBB	P02675	FGB	16	Unión a chaperonas
Fructosa-bifosfato aldolasa A	ALDOA	P04075	ALDOA	39	Unión a actina
Aloha-enolasa	ENOA	P06733	ENO1	47	Unión a caderina
Factor de elongación putativo 1-similar a alfa 3	EF1A3	Q5VTE0	EEF1A1P5	50	Actividad GTPasa
Proteína ribosomal 60S L8	RL8	P62917	RPL8	28	Unión a ARN
Receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina	LGR5	O75473	LGR5	98	Actividad del receptor de péptido acoplado a proteína G
Immunoglobulina kappa variable 1D-43	KVD43	A0A0B4J1Z2	IGKV1D-43	10	Respuesta inmune adaptativa
Glutamina--fructosa-6-fosfato aminotransferasa [isomerizante] 2	GFPT2	O94808	GFPT2	77	Unión de derivados de carbohidratos
Immunoglobulina lambda variable 5-39	LV539	A0A0G2JS06	IGLV5-39	11	Respuesta inmune adaptativa
Immunoglobulina kappa variable 1D-12	KVD12	P01611	IGKV1D-12	10	Unión al antígeno
Globulina fijadora de hormonas sexuales	SHBG	P04278	SHBG	40	Unión a andrógenos
Similar al antígeno CD5	CD5L	O43866	CD5L	36	Actividad del receptor depurador
Actina alfa músculo esquelético	ACTS	P68133	ACTA1	42	Unión a ADP
Subunidad 2 del complejo de pequeña elongación	ICEZ	Q659A1	ICEZ	11	Regulación de pequeños ARN nucleares
Sinaptotagmina-7	SYT7	O43581	SYT7	45	Unión de fosfolípidos dependientes de calcio
Fucutina	FKTN	O75072	FKTN	54	Transferasa
Immunoglobulina kappa variable 6D-21	KVD21	A0A0A0MT36	IGKV6D-21	10	Respuesta inmune adaptativa
Miosina-15	MYH15	Q9Y2K3	MYH15	22	Unión a filamento de actina
Immunoglobulina de cadena pesada variable 3-48	HV348	P01763	IGHV3-48	11	Unión al antígeno
Immunoglobulina de cadena pesada variable 3-53	HV353	P01767	IGHV3-53	10	Unión al antígeno
Obscurina	OBSCN	Q5VST9	OBSCN	87	Unión a calmodulina
Proteína similar al Ninein	NINL	Q9Y2I6	NINL	156	Unión al calcio
Proteína 9 del complejo regulador de la dineína	DRC9	Q9H095	IQCG	52	Unión al calcio
Porteina 17 de dedo RING	RNF17	Q9BXT8	RNF17	185	Unión a iones metálicos
Homólogo de las proteínas Wnt	WLS	Q5T9L3	WLS	62	Unión a proteínas Wnt
Proteína 618 de dedo de Zinc	ZN618	Q5T7W0	ZNF618	105	Unión al DNA
Factor 2 de determinación derecha-izquierda	LFTY2	O00292	LEFTY2	32	Actividad de citoquina
Proteína de asociación a Ras con dominio diluido	RADIL	Q96JH8	RADIL	117	Unión a GTPasa
Endofilina-A3	SH3G3	Q99963	SH3GL3	39	Unión a lípidos
tRNA (homólogo de guanina (10) -N2) -metiltransferasa	TRM11	Q7Z4G4	TRMT11	53	Actividad metiltransferasa
Proteína receptora de transferrina 1	TFR1	P02786	TFRC	85	Unión a chaperonas
Immunoglobulina lambda variable 3-9	LV39	A0A075B6K5	IGLV3-9	10	Unión al antígeno

ANEXO 16. Análisis de expresión de marcadores osteogénicos durante la diferenciación



Representación de los marcadores: a) Miembro 3 de la familia Wnt (Wnt3); b) Interleucina 1-beta (IL-1B); c) Osteocalcina (OC); d) Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPARG); e) Proteína morfogénica ósea 2 (BMP2); f) Factor de transcripción 2 de la familia Runx (RUNX2); g) Escerostina (SOST) obtenidos con tecnología n-Counter (Nanostring).

ANEXO 17. Análisis de expresión de marcadores osteogénicos en células SaOS-2 tratados con suero de pacientes con HOP y suero de controles, usando tecnología n-Counter





Este trabajo presenta el único caso reportado en el mundo de Heteroplasia Ósea Progresiva en dos gemelas univitelinas idénticas, que presentan la misma mutación de novo en heterocigosis en el gen GNAS, sin embargo, mientras una de ellas permanece asintomática, la otra sufre una forma inusualmente rápida e incapacitante de la enfermedad desde su infancia. El objetivo general de este trabajo se centra en la caracterización de la enfermedad mediante un abordaje “ómico” traslacional, inmunológico y celular y la evaluación de terapias farmacológicas. Los avances que aporte este trabajo amplían el entendimiento de la enfermedad y de patologías relacionadas con mutaciones en GNAS.