



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en BIOTECNOLOGÍA

**MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE
GRADO**

**TÍTULO: Análisis de activación de p-ERK
mediado por FGF en fibroblastos de
pacientes con Mucopolisacaridosis tipo VI
(MPS VI)**

SARA RUIZ DONOSO
JULIO 2023

D. ÁNGEL CARLOS ROMÁN GARCÍA Y Dña SONIA MULERO NAVARRO, profesor/a del Departamento de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA de la Universidad de Extremadura.

INFORMAN:

Que D./Dña. SARA RUIZ DONOSO ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Grado y consideran que la memoria reúne los requisitos necesarios para su evaluación.

Badajoz, día de mes de año

Fdo. Nombre y apellidos de los Tutores

ÍNDICE

1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>ABSTRACT</u>	2
3. <u>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES GENERALES</u>	
3.1 Mucopolisacaridosis, características generales.....	3
3.2 Mucopolisacaridosis tipo VI o síndrome Maroteaux Lamy.....	7
3.3 Dermatan sulfato y su papel en la ruta de FGFs.....	9
3.4 FGFRs y su señalización.....	11
3.5 <i>FGFR-1</i> y su posible papel en mucopolisacaridosis tipo VI....	14
3.6 Ampliación de la vía MAPK: RAS-ERK.....	16
3.7 Efectos de la administración de surfeno antagonista de glucosaminoglicanos sulfatados.....	18
4. <u>OBJETIVOS</u>	19
5. <u>METODOLOGÍA</u>	
5.1 Cultivos celulares.....	20
5.2 Tratamientos con surfeno y FGF.....	21
5.3 PCR cuantitativa en tiempo real	23
5.4 Extracción de proteínas.....	25
5.5 Método Bradford.....	26
5.6 SDS-PAGE.....	28
5.7 Western Blot.....	30
5.8 Stripping.....	35

6.	<u>RESULTADOS</u>	
6.1	Efecto del surfeno en la morfología y viabilidad celular en cultivo de fibroblastos de pacientes con MPS VI y control.....	36
6.2	Comparación de los niveles de expresión de p-ERK y ERK total entre cultivos de fibroblastos de pacientes con mucopolisacaridosis tipo VI y cultivos de fibroblastos de pacientes control tratados con FGF y surfeno.....	37
6.3	Análisis de la expresión del gen <i>FGFR1</i> en pacientes con mucopolisacaridosis tipo VI.....	39
7	<u>DISCUSIÓN</u>.....	41
8	<u>CONCLUSIÓN</u>.....	42
9	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>.....	43

1. RESUMEN

La mucopolisacaridosis tipo VI (MPS VI), también conocida como síndrome de Maroteaux-Lamy, es una enfermedad de almacenamiento lisosomal resultante de la deficiencia o ausencia de Arilsulfatasa B. Los síntomas característicos incluyen afectación esquelética, facies tosca, cardiopatía y compresión de la médula espinal cervical, que van, desde formas lentas hasta formas rápidamente progresivas. A nivel molecular, esta deficiencia conduce a la acumulación patológica de dermatán sulfato, que altera la vía FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), que se encuentra en la membrana celular o matriz extracelular, actuando como co-receptor y activándola.

En este trabajo fin de grado se recogen los estudios realizados con ERK, centrándonos en su forma activa, p-ERK (su forma fosforilada) en la ruta de señalización de FGF que se encuentra alterada por el exceso de dermatán sulfato en pacientes con MPS VI. Para ello, se analizará los niveles de las formas fosforiladas y no fosforiladas de la proteína ERK en cultivos de fibroblastos inmortalizados de pacientes con MPS VI y pacientes control tratados con FGF a diferentes tiempos. Además, se medirán los niveles de expresión del gen *FGFR1* en pacientes con MPS VI. Por último, basándonos en la utilización de surfeno, un antagonista de glucosaminoglicanos, que inhibe su acción, se observará la variación de los niveles de p-ERK y ERK en cultivo de fibroblastos de pacientes con MPS y se comparará con los resultados obtenidos en células de pacientes con MPS VI sin tratar.

2. ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI), also known as Maroteaux-Lamy syndrome, is a lysosomal storage disease resulting from the deficiency or absence of Arylsulfatase B. Characteristic symptoms include skeletal involvement, coarse facies, heart disease, and cord compression. cervical spinal cord, ranging from slow to rapidly progressive forms. At the molecular level, this deficiency leads to the pathological accumulation of dermatan sulfate, which alters the FGF (fibroblast growth factor) pathway, which is found in the cell membrane or extracellular matrix, acting as a co-receptor and activating it.

In this final degree project, the studies carried out with ERK are collected, focusing on its active form, p-ERK (its phosphorylated form) in the FGF signaling pathway that is altered by excess dermatan sulfate in patients with MPS VI. . To do this, the levels of the phosphorylated and non-phosphorylated forms of the ERK protein will be analyzed in cultures of immortalized fibroblasts from patients with MPS VI and control patients treated with FGF at different times. In addition, the expression levels of the *FGFR1* gene will be measured in patients with MPS VI. Finally, based on the use of surfen, a glycosaminoglycan antagonist, which inhibits their action, the variation in p-ERK and ERK levels in cultured fibroblasts from MPS patients will be observed and compared with the results obtained in cells. of patients with untreated MPS VI.

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES GENERALES

3.1 Enfermedades generadas por déficit enzimático: Mucopolisacaridosis

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de enfermedades raras de baja prevalencia, que varía entre 1/1500 y 1/7000 nacidos vivos que afecta a todos los grupos étnicos y géneros por igual, excepto en las que la condición está ligada al cromosoma X. Se caracterizan por la deficiencia de enzimas que participan en el metabolismo de los glucosaminglucanos (GAG) a nivel lisosomal, produciendo alteraciones de múltiples órganos y sistemas. Los glicosaminoglicanos están constituidos por cadenas de disacáridos, que se repiten en forma secuencial y que se unen a su vez a una proteína central, constituyendo moléculas más complejas denominadas proteoglicanos. Estos últimos forman parte de la matriz extracelular de la mayor parte de los tejidos, lo que se refleja en el carácter multisistémico de las MPS. (Suarez-Guerrero, J. L., et al., (2016)). Los glicosaminoglicanos se degradan en los lisosomas por diferentes vías catabólicas para los diversos tipos, pero que comparten entre sí algunas de las enzimas involucradas. Este proceso de degradación se encuentra alterado en las MPS, produciéndose un depósito intralisosomal progresivo de los sustratos insuficientemente catabolizados. Esta acumulación conduce finalmente a la muerte celular, a la liberación de los glicosaminoglicanos hacia los líquidos extracelulares y a su excreción por la orina. Esto permite la identificación de los pacientes afectados a través del análisis del patrón de glicosaminoglicanos urinarios, siendo su identificación fundamental para iniciar un tratamiento oportuno.

Tipos de mucopolisacaridosis

Siete tipos de MPS se clasifican según la falta o el defecto en una de las once enzimas lisosomales específicas y se describen como MPS I a MPS IX (excluyendo MPS V y VIII, que ya no se usan). Las características clínicas varían según el tipo de MPS y la gravedad clínica de la enfermedad. (Michaud, M., et al., (2020)). Presentan características clínicas comunes, pero también hay síntomas que son

más propios de un tipo de patología que de otro, todas las MPS son trastornos autosómicos recesivos excepto la MPS II que está ligada al cromosoma X.

Las diferencias entre los diversos fenotipos dependen parcialmente del tipo de sustrato acumulado, pero también del grado de deficiencia enzimática, del genotipo y de otros factores hasta ahora desconocidos.

Los individuos afectados por MPS I se han clasificado tradicionalmente como portadores de uno de los tres síndromes de MPS I (síndrome de Hurler, síndrome de Hurler-Scheie o síndrome de Scheie) en su forma grave o atenuada tiene una actividad limitada de la enzima α -L-iduronidasa (IDUA) que desglosa DS (dermatan sulfato) y HS (heparán sulfato). Estos GAG permanecen almacenados en las células y causan un daño progresivo de varios tejidos, incluido el hueso y, en casos graves, el cerebro. Las manifestaciones típicas incluyen cara tosca, opacidad de la córnea, retraso del desarrollo, retraso mental, retraso del crecimiento, contracturas de las articulaciones, cifoescoliosis, disostosis múltiple, pérdida de la audición, engrosamiento de las válvulas cardíacas, hepatoesplenomegalia y hernias umbilicales e inguinales. El síndrome de Scheie, la forma más leve de la enfermedad se caracteriza por una cara tosca y un físico fornido con inteligencia normal, mientras que el síndrome de Hurler muestra síntomas neurológicos como dislexia, termanestesia y degradación cognitiva. Los pacientes con síndrome de Hurler desarrollan síntomas iniciales como hernias, hepatomegalia, 50 años. (Stapleton, M., et al (2018)).

Al igual que MPS I, MPS II también tiene formas leves y graves. La forma grave tiene características similares al síndrome de Hurler y la forma leve es análoga al síndrome de Hurler/Scheie o de Scheie, con una vida útil más prolongada. Ambas formas surgen de la deficiencia de iduronato-2-sulfatasa (I2S) que cataliza la degradación de DS y HS. Se hereda de manera ligada al cromosoma X, lo que da como resultado que la mayoría de los hombres se vean afectados. Sin embargo, en raras ocasiones, las mujeres heterocigotas manifiestan hallazgos de MPS II. Se cree que esto es el resultado de la inactivación sesgada del cromosoma X normal heredado del padre y la expresión del cromosoma X mutado heredado de la madre.

Entre las anomalías pueden incluir retraso en el desarrollo, retraso mental, engrosamiento de las características faciales, incluido el engrosamiento de los labios, la lengua y las fosas nasales, disostosis múltiple, retraso progresivo del crecimiento que resulta en baja estatura y rigidez articular asociada con la restricción de movimientos. Los niños afectados también pueden tener una cabeza anormalmente grande (macrocefalia), cuello corto, tórax ancho, retraso en la erupción de los dientes, pérdida de audición, hepatoesplenomegalia y hernias inguinales y umbilicales. La esperanza de vida también difiere en las dos formas; los pacientes con la forma leve alcanzan la edad adulta, mientras que los afectados por la forma grave suelen morir dentro de las dos primeras décadas de vida. (Germain, D. P., et. al., (2016)).

MPS III se caracteriza por cuatro tipos; MPS IIIA, IIIB, IIIC y IIID debido a la falta de heparán-N-sulfatasa (*SGHS*), α -N-acetilglucosaminidasa (*NAGLU*), α -glucosaminidasa acetiltransferasa (*HGSNAT*) y N-acetil-glucosamina 6-sulfatasa (*GNS*), respectivamente. Un defecto en cualquiera de las cuatro enzimas compromete la degradación de HS. Se caracteriza por una degeneración grave del sistema nervioso central (SNC) y un retraso progresivo del desarrollo y retraso mental. Es de destacar que MPS I, II, III y MPS VII comparten una degradación parcial o incompleta de HS que da como resultado la participación del SNC.

MPS IV es causada por la deficiencia de cualquiera de dos enzimas distintas, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (*GALNS*) y β -galactosidasa (*GLB1*) dando como resultado MPS IVA y IVB. Tanto el condroitín-6-sulfato (C6S) como KS (keratán sulfato) se acumulan en MPS IVA, mientras que solo KS se acumula en MPS IVB. Las características clínicas incluyen engrosamiento de la cara, enanismo de cuello y tronco cortos, opacidad corneal fina, displasia esquelética, dientes pequeños con esmalte delgado y formación frecuente de caries, subluxación atlantoaxial, compresión de la médula espinal cervical, pectus carinatum, cifoescoliosis, genu valgum bilateral, pie plano, hiperlaxitud de las articulaciones, marcha de pato con tendencia a caerse y pérdida de la audición.

Además, los pacientes con una forma grave de MPS IVA tienen fatiga fácil, apnea del sueño, respiración corta con restricción pulmonar, obstrucción traqueal e infecciones respiratorias y del oído recurrentes. Las características clínicas de MPS IVB suelen ser más leves que las asociadas con MPS IVA.

MPS VII se caracteriza por una deficiencia de la enzima β -d-glucuronidasa que provoca la acumulación de C4S, C6S, DS y HS en los tejidos. Estos pacientes tienen un retraso mental moderado que no progresa con el crecimiento de los pacientes. A menudo se presentan anomalías esqueléticas.

También se han informado hernias, opacidad de la córnea, hidrocefalia, baja estatura, enfermedades cardíacas y rasgos faciales toscos. Los recién nacidos con una forma grave pueden experimentar una acumulación anormal de fluidos corporales en varios tejidos (hidropesía fetal).

MPS IX es una forma extremadamente rara de MPS debido a una deficiencia de la enzima hialuronidasa, que se necesita para descomponer el hialuronano (ácido hialurónico). Esta forma de MPS se describió por primera vez en 1996. Las mutaciones supuestamente causantes se encontraron en el gen *HYAL1*, que codifica una de las tres hialuronidasas (Paciotti, S., et al., (2012)). Los síntomas pueden incluir baja estatura, quistes, infecciones de oído frecuentes, paladar hendido y el desarrollo de masas de tejido blando.

TIPO	NOMBRE	GEN	LOCALIZACIÓN DEL GEN (32,33)	DEFECTO ENZIMÁTICO	ACÚMULO
I I ATN*	Hurler Schele	IDUA	4p16.13	α -L-iduronidasa	Dermatán sulfato
II	Hunter	IDS (Cr.X)	Xq28	Idurono sulfatasa	Heparán sulfato
III	Sanfilipo				

	A	SGSH	17q25.3	Heparán N sulfatasa	Heparán
	B	NAGLU	17q21.1	N-acetil glucosaminasa	sulfato
	C	HGSNAT	14q o 21q	α -	Heparán
	D	GNS	12q14	glucosaminidotransferasa N-acetilglucosamina 6- sulfatasa	sulfato
IV	Morquio				Queratán
	A	GALNS	16q24.3	Galactosamina-6-	sulfato
	B	GLBI	3p21.3	sulfatasa β -Galactosidasa	
VI	Maroteaux- Lamy	ARSB	5q11-q13	Arilsulfatasa beta	Dermatán sulfato
VII	Sly	GUSB	7q21.11	β -Glucoronidasa	Dermatán sulfato Heparán sulfato
IX	Síndrome de Natowicz	HYALI	3p26.1	Hialuronoglucosaminidasa 1	Ácido hialurónico

Tabla 1: tipos de mucopolisacaridosis indicando el tipo, nombre, gen, la localización de dicho gen, el defecto enzimático y que tipo de GAG se acumula.

3.2 Mucopolisacaridosis tipo VI o síndrome Maratoux-Lamy

La Mucopolisacaridosis tipo VI es uno de los tipos más raros de mucopolisacaridosis, un trastorno de almacenamiento lisosomal autosómico recesivo descrito en 1963 por el Dr. Pierre Maroteaux y el Dr. Maurice Lamy. Es causada por mutaciones en el gen Arilsulfatasa B (ARSB), localizado en 5q13-5q14, que codifica para la enzima N-acetilgalactosamina -4-sulfatasa (alias arilsulfatasa B (ASB)). (Litjens T, et al.,(1989)). La deficiencia enzimática de ASB produce la acumulación de dermatán sulfato en las células. La incidencia aproximada de la MPS VI es de 0.36 a 1.30 por cada 100,000 nacidos vivos. Aparentemente existe una alta tasa de subdiagnóstico, por lo que la incidencia podría ser mucho mayor. De esta forma el defecto de producción de las enzimas lisosomales produce un acúmulo progresivo

de glucosaminoglicanos (GAG o mucopolisacáridos) no degradados o parcialmente degradados.

Aunque los lisosomas son ubicuos, el depósito de macromoléculas se restringe normalmente a aquellas células, tejidos y órganos en que la degradación de sustratos es mayor. El acúmulo primario de material de depósito puede causar una cadena de alteraciones secundarias en otras funciones bioquímicas y celulares. Así, en distintas enfermedades lisosomales parecen estar implicados la acumulación de gangliósidos GM2 en el cerebro (puede alterar la dendritogénesis), la alteración de la neurotransmisión (la alteración de los receptores AMPA induce dendritogénesis ectópica), el tráfico vesicular, la autofagia, la inflamación (presencia de microglía activada, niveles elevados de citocinas y estrés oxidativo) y la apoptosis. (Parkinson-Lawrence, E. J., et al, (2010)).

Algunos estudios muestran en fibroblastos de pacientes con MPS VI: depósito lisosomal, alteración de la autofagia, acúmulo de proteínas poliubiquitinadas y disfunción mitocondrial. En ratas MPS VI observan estas mismas anomalías junto con inflamación y muerte celular en las vísceras, pero no en el sistema nervioso central donde no existe acúmulo de dermatán sulfato. Además, la terapia génica en las ratas MPS VI corrige la alteración de la autofagia, la inflamación y la apoptosis. (Tessitore, A., et al., (2009)). Además, en modelos animales de MPS VI se observa que el depósito de GAG produce inflamación y apoptosis en el cartílago. (Simonaro, C. M., et al., (2001)). Como parte de esta cascada inflamatoria se liberan en los condrocitos factor de necrosis tumoral (TNF- α) y otras citocinas inflamatorias (como IL-1 β), dando lugar a apoptosis. Además, se liberan metaloproteinasas de la matriz, que contribuyen a la destrucción articular y ósea, al tiempo que se produce osteopenia por activación osteoclástica. (Simonaro, C. M., et al., (2008)).

Debido a la acumulación de dermatán se presentan 2 espectros de la enfermedad, la leve o lenta y la severa o rápida, cada una con diversas complicaciones. La severa comienza generalmente antes de los 2 años de edad, presentando complicaciones cardíacas que llevan al deceso entre la segunda o tercera décadas de la vida. La forma leve comienza tardíamente, siendo las

alteraciones músculo esqueléticas leves las primeras en aparecer clínicamente y falleciendo entre la cuarta o quinta década de vida.

Entre las principales características clínicas para ambos espectros se encuentran: baja talla para la edad, disostosis múltiple (como principal característica de la enfermedad en su forma severa), rigidez articular, opacidad corneal, facies tosca y a nivel cardiovascular valvulopatías y miocardiopatías como principal causa de muerte. De forma poco frecuente se pueden presentar macrocefalia, frente prominente, puente nasal deprimido, compromiso pulmonar y hernias inguinales o umbilicales. El desarrollo cognitivo usualmente es normal. (Giugliani, R., et al (2010)).

La acumulación del DS lleva a varias complicaciones a nivel pulmonar extrínsecas e intrínsecas, hepatomegalia, opacidad corneal, glaucoma y el edema de papila con atrofia óptica se aprecia en MPS VI avanzada. Alteraciones cardíacas como las estenosis y/o las insuficiencias en las válvulas mitral, tricúspide y aórtica son muy características de esta MPS; además, otras como la endocarditis y la hipertrofia ventricular pueden estar presentes en estas personas.



Figura 1: Paciente de MPS VI de 16 años de edad que progresa rápidamente: fotografía de la cara que muestra facies tosca: protuberancia frontal, lengua agrandada, labios gruesos, dentición anormal e hiperplasia gingival.

3.3 Dermatan sulfato y su papel en la ruta de FGFs

Los glicosaminoglicanos se han implicado en la unión y activación de una variedad de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. Aunque el dermatán

sulfato participa en muchos de los mismos procesos biológicos que la heparina y el heparán sulfato, las interacciones del dermatán sulfato han sido menos estudiadas.

El dermatán sulfato es un tipo de glicosaminoglicano (GAG), también conocido como condroitín sulfato B, componente esencial de la matriz extracelular siendo un polisacárido largo sin ramificaciones formado por unidades de disacáridos que contienen azúcares modificados N-acetilgalactosamina y un ácido urónico que es el iduronato. Es una red tridimensional de moléculas que rodea las células en los tejidos del cuerpo, desempeñando diversos roles en la regulación de la comunicación celular y la función de los tejidos.

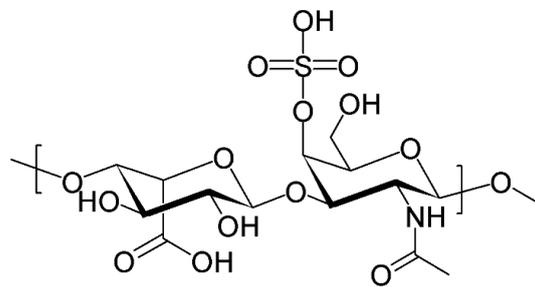


Figura 2: molécula de dermatán sulfato polisacárido largo sin ramificaciones y contiene repeticiones de una unidad de disacáridos. Las unidades de disacáridos contienen azúcares modificados, N-acetilgalactosaminas (GalNAc) y un ácido urónico, el iduronato.

En relación con la ruta FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) , el dermatán sulfato puede actuar como su co-receptor. Los FGF se unen a los receptores de la superficie celular, y para que se produzca una señalización adecuada, generalmente se requiere la presencia de un co-receptor de heparán sulfato o dermatán sulfato. Estos GAG se unen a los FGF y mejoran su capacidad para unirse y activar los receptores de FGF. Se ha demostrado que el dermatán sulfato interactúa con varios miembros de la familia de los FGF, como el FGF-2 y el FGF-7, y contribuye a la regulación de su actividad biológica. (Penc, S. F., et al., (1998)). Por ello, la acumulación de dermatán sulfato que ocurre durante el síndrome de Maratoux-Lamy puede afectar la ruta de señalización de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) de varias maneras.

En primer lugar, puede darse una modificación de la unión de los FGF a los receptores: el dermatán sulfato puede interactuar con los FGF y modificar su capacidad para unirse a los receptores de FGF. Una acumulación de dermatán

sulfato puede alterar esta interacción y afectar la formación de complejos de FGF-receptor, lo que resulta en una regulación alterada de la señalización de FGF.

Además, puede influir en la afinidad de los FGF por los receptores y modular su actividad biológica. Estos acúmulos pueden cambiar la afinidad de los FGF por sus receptores, lo que puede alterar la respuesta celular y la señalización mediada por FGF. Asimismo, también puede influir en la distribución espacial y temporal de los FGF en los tejidos, afectando a la estabilidad de los FGF o su interacción con otros componentes de la matriz extracelular, lo que puede resultar en una distribución anormal de los FGF en los tejidos y una alteración de la señalización de FGF.

3.4 FGFRs y su señalización

Los FGFRs constituyen una familia de receptores tirosina quinasa cuya señalización está implicada en múltiples funciones en diferentes tipos celulares y se encuentra regulada por complejos patrones de expresión de sus isoformas y de afinidad por sus diferentes ligandos, los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs). Algunos de los procesos mejor descritos en los que participa esta familia de receptores son la regulación de diferentes fases del desarrollo embrionario (Kimelman, D., & Kirschner, M. (1987)) y la formación de diferentes órganos (De Moerlooze, L., et al., (2000)). En el organismo adulto, participan en la homeostasis y reparación tisular, en la angiogénesis y en procesos inflamatorios (Turner, N., & Grose, R. (2010)).

En condiciones fisiológicas, la activación de los FGFRs ocurre como en cualquier receptor tirosina quinasa, tras la unión a su ligando (Beenken, A., & Mohammadi, M. (2009)). Existen siete residuos de tirosina que pueden ser fosforilados tras la activación del receptor descritos para *FGFR1*, Y463 (en posición yuxtamembranal), Y583/Y585 (en el inserto quinasa), Y653/Y654 (en el bucle de activación), Y730 (en el dominio quinasa) e Y766 (en el extremo C-terminal) 102,103. Los dominios quinasa de FGFR1-4 se encuentran altamente conservados, con un 75-92% de homología (Kobayashi, S., et al., (2005)). La mayoría de los residuos de autofosforilación se encuentran conservados entre los diferentes FGFRs. Los residuos de tirosina fosforilados constituyen sitios de unión para diversas proteínas

adaptadoras como FRS2 (sustrato 2 de FGFR), que es fosforilado por el FGFR activo.

Otras proteínas adaptadoras como GRB2 pueden unirse a través de un dominio SH2 de unión a fosfotirosina al FRS2 ya fosforilado. A su vez, GRB2 se une a SOS, que es un factor de intercambio de nucleótidos guanina. Al formarse el complejo RTK-GRB2-SOS, SOS se activa y promueve la retirada de GDP (Guanina di-fosfato) de la proteína RAS y su consecuente unión a GTP (Guanina tri-fosfato), produciendo su activación. Así, RAS activa a las proteínas RAF mediante su fosforilación, y éstas entonces fosforilan a MEK1 y MEK2, que finalmente fosforilan a ERK (p42/p44), que será translocada al núcleo para activar factores de transcripción que regularán la expresión de genes implicados en proliferación celular, muerte celular, diferenciación, migración y angiogénesis. (Cseh, B., et al.,(2014)) (Roskoski R., Jr (2012)).

Por otro lado, la unión de las proteínas adaptadoras GRB2 y GAB1 al FGFR permitirá su unión a PI3K, que será entonces activada por fosforilación. PI3K es una quinasa que una vez activa fosforila lípidos de membrana. Su activación provoca la producción de PIP3 (fosfatidil inositol trifosfato), que fosforila a AKT, activándola. Posteriormente, AKT activa a otras proteínas que producen señales de supervivencia y proliferación, tales como mTOR, e induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como MCL-1. Igualmente, AKT favorece la proliferación celular inhibiendo varios represores del ciclo celular como FOXO, e induce la transcripción de genes pro-angiogénicos como HIF1 α y VEGF, implicados en diferentes procesos tumorogénicos 107. Uno de los principales reguladores de esta ruta es PTEN, que defosforila PIP3 a PIP2, disminuyendo así la activación de AKT (Rafalski, V. A., & Brunet, A. (2011)).

Otra proteína adaptadora que también puede ser fosforilada y activada directamente por el FGFR (Knights, V., & Cook, S. J. (2010)) es la PLCY (fosfolipasa C gamma), que se une al FGFR en su residuo fosforilado de tirosina Y766 (Mohammadi, M., et al (1991)). Una vez fosforilada, PLCY provoca la liberación de calcio intracelular que induce la función de los miembros dependientes de calcio de la familia protein-quinasa C (PKC), y la señalización de MAPK a través de la

fosforilación de RAF (Eswarakumar, V. P., et al., (2005)).

Por otro lado, la activación de los FGFRs promueve la inducción de otras rutas de señalización oncogénicas, como la ruta de las STATs (Hart, K. C., et al., (2000)) que es mediada por la fosforilación en el residuo de tirosina Y766 del FGFR, a la que STAT3 se une, provocando su fosforilación (Dudka, A. A., et al., (2010)). La activación de las STATs induce su propia dimerización y translocación al núcleo, donde promueven la inducción de diferentes genes diana implicados en proliferación, supervivencia, invasión e inmunosupresión, tales como C-MYC, MCL-1 o PIM-1 (Trusolino, L., et al., (2010)).

La regulación de la señalización inducida por los FGFRs se encuentra regulada por diferentes proteínas como la fosfatasa 3 de MAPK (MKP3), las proteínas SPROUTY (SPRY) (Casci, T., Vinós, J., & Freeman, M. (1999)) y los miembros de la familia de expresión similar a FGF (SEF) (Fürthauer, M., et al (2002)). Esta modulación de la señal de FGFR puede ocurrir a diferentes niveles de la cascada de señalización. Por ejemplo, MKP3 desfosforila a ERK, atenuando la señalización MAPK, y las proteínas SPROUTY compiten con la proteína adaptadora GRB2 de forma dominante negativa, evitando la activación de RAS por SOS (Hacohen, N., et al., (1998)).

Además, la señalización de FGFR se encuentra negativamente regulada por la endocitosis de los FGFRs y su posterior degradación en lisosomas, proceso que regula la proteína CBL, que se encarga de ubiquitinar al FGFR, marcándolo así para su posterior degradación. (Mohapatra, B., et al., (2013)).

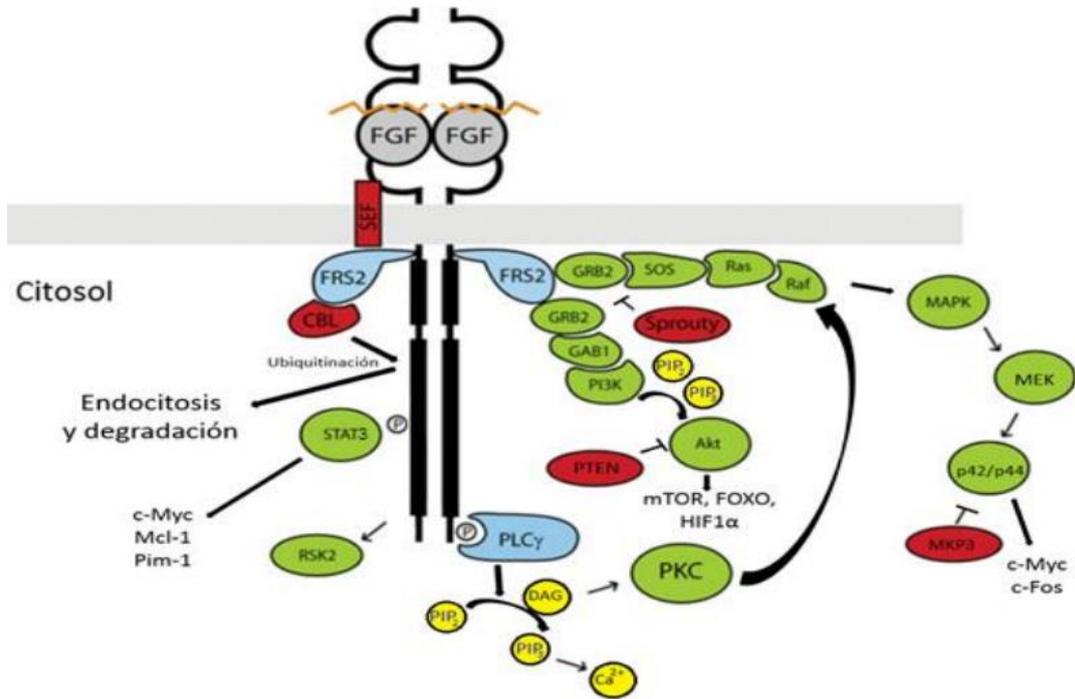


Figura 3. Esquema de la señalización intracelular de los FGFRs. En azul, proteínas adaptadoras; en verde, proteínas de transducción; en rojo, proteínas reguladoras de la señalización; en amarillo, mensajeros intermediarios. Después de la activación de FGFR inducida por ligando, se inician varias cascadas de señalización corriente abajo. Dos jugadores centrales, FRS2 y PLC γ (en azul) se unen directamente a los receptores. FRS2 está constitutivamente asociado con el receptor, y tras la activación de la quinasa del receptor, se fosforila en varios residuos de tirosina que, a su vez, reclutan dos importantes vías de señalización, Ras/MAPK y Vías PI3K/Akt. PLC γ se une a una fosfotirosina en la cola C-terminal de los FGFR. El reclutamiento de PLC γ culmina con la activación de PKC. Varios reguladores negativos también están asociados con Señalización de FGF (en rojo). La heparina soluble (en naranja), un polisacárido altamente sulfatado, puede tomar el lugar de HSPG en el complejo FGF y, a menudo, se usa experimentalmente para aumentar la señalización de FGF. (Wesche, J., et al., (2011)).

3.5 FGFR-1 y su posible papel en mucopolisacaridosis tipo VI

FGFR1 pertenece a la familia de los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos, localizado en el brazo corto del cromosoma 8 (8p11.23), que codifica el receptor del factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGFR1). Este receptor interactúa con factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) para activar la señalización en el interior de las células. Dicha señalización participa en muchos procesos: división celular, la regulación del crecimiento y la maduración celular. De tal forma que es importante para el desarrollo y el crecimiento normal de varias partes del cuerpo del organismo, incluyendo el cerebro, los huesos craneofaciales, así como los huesos de las manos, pies, brazos y piernas.

Además, la señalización por la proteína *FGFR1* juega un papel crítico en la formación supervivencia y migración de las neuronas en varias áreas del cerebro. Así parece ser esencial para las neuronas que producen la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que dirige el desarrollo sexual antes del nacimiento y durante la pubertad, siendo importante para la función normal de los ovarios en las mujeres y los testículos en los hombres.

Mutaciones en el gen *FGFR1* conllevan a alteraciones en la proteína FGFR1 y esta proteína alterada puede causar una señalización prolongada que promueve la fusión precoz de los huesos del cráneo y afectar al desarrollo de los huesos de las manos y los pies. Un ejemplo de ello se encuentra en el síndrome de Pfeiffer donde la mutación en los genes *FGFR1* o *FGFR2* pueden provocar la fusión prematura de los huesos del cráneo y con ello limitar el crecimiento del cerebro dando lugar a un retraso del desarrollo y otros problemas neurológicos. Además, pueden tener problemas en otras articulaciones que les limitan la movilidad, anomalías de la cara y las vías respiratorias. Asimismo, la alteración en la expresión de dichos genes puede mejorar algunos aspectos relacionados con el cáncer tales como la división, movimiento celular y el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que alimentan un tumor en crecimiento.

En este estudio se comprobará si ocurre un aumento de la expresión del gen *FGFR1* en pacientes con MPS VI. Este aumento de expresión podría deberse a una respuesta adaptativa del organismo para contrarrestar los efectos de la acumulación de dermatán sulfato manteniendo así su función celular y tisular. Esto podría deberse a que la acumulación de dermatán sulfato en los tejidos puede desencadenar una respuesta inflamatoria crónica y por lo tanto las citoquinas inflamatorias liberadas durante el proceso podrían actuar como factores de crecimiento estimulando la expresión de dicho gen. Además, también podría deberse a una respuesta compensatoria del organismo para aumentar la disponibilidad de receptores de FGF aumentando así la señalización de estos y contrarrestando los efectos adversos de acumulación de dermatán.

3.6 Ampliación de la vía MAPK: RAS-ERK

El dermatán sulfato además se ha visto implicado en la modulación de la ruta de señalización de ERK. Se ha demostrado que puede activar la vía de señalización ERK en varias células y tejidos. La interacción entre el dermatán sulfato y los receptores de la superficie celular puede activar los receptores de tirosina quinasa y desencadenar la cascada de señalización que conduce a la fosforilación y activación de la proteína ERK. (Catlow, K., et al., (2003)).

Las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) son cascadas de señalización conservadas evolutivamente que vinculan los estímulos extracelulares e internos con el control de múltiples procesos celulares tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, incluida la adhesión, proliferación, supervivencia, metabolismo, migración, invasión y diferenciación celular. Y transcripción de genes. Se sabe que existen seis módulos MAPK diferentes en los mamíferos. Nos centraremos aquí en el eje RAS/ERK.

En condiciones fisiológicas, el factor de crecimiento se une a su receptor tirosina quinasa en la superficie de la membrana plasmática, induciendo su fosforilación y la unión de las proteínas adaptadoras de la familia SHC. A estas se une GRB2, proteína encargada de reclutar los factores de intercambio de nucleótidos de guanina como SOS, los cuales activan a RAS en la membrana mediante el intercambio de GDP por GTP. Cuando RAS está activo fosforila a las proteínas de la familia RAF, formada en mamíferos por tres miembros: A-RAF, B-RAF y c-RAF.

Estas junto con MEK1/2 y ERK1/2 forman un complejo de activación secuencial, en el cual RAF fosforila a MEK y este a ERK, mediante su unión a proteínas de andamiaje o scaffold. Estas proteínas actúan como plataformas de activación sitio-específicas que coordinan la activación de ERK, regulando su localización, intensidad y duración. Estas permiten una mayor complejidad y diversificación de la señal y con ello, regular de manera más precisa los diferentes procesos celulares en los que ERK interviene (Zaballos et al., (2019)).

MEK1/2 fosforila a ERK1 en los residuos Thr202 y Tyr204, y a ERK2 en los residuos Thr185 y Tyr187. La fosforilación de ambos residuos permite la activación completa de ERK, pudiendo fosforilar a más de 150 sustratos citoplasmáticos y nucleares, los cuales promueven la transcripción de numerosos genes (Yoon and Seger, (2006)). Entre los efectores citoplasmáticos más importantes se encuentran RSK, MSK y paxilina, y entre los nucleares están c-MYC, c-FOS y miembros de la familia ETS (E26 transformation-specific), como ELK1.

Durante el proceso de señalización, los diferentes componentes de la vía pueden aparecer formando monómeros o dímeros, siendo esto de gran importancia en la transducción de la señal. Un ejemplo de ello son las diferentes proteínas RAF que pueden formar homodímeros o heterodímeros entre sí y de esta manera activar la vía de forma específica de dímero (Lavoie and Therrien, (2015)). La mutación activadora V600E en la proteína B-RAF le confiere actividad catalítica sin la necesidad de dimerizar, estando constitutivamente activa la proteína en forma monomérica. Por otro lado, el estudio de la dimerización de ERK ha revelado que su forma dimérica es crucial en la activación de sus efectores citoplasmáticos, no así de los nucleares (Casar et al., (2008)). Esto demuestra que no solo es importante el grado de fosforilación de los componentes de la vía sino también el estado monómero/ dímero en el que se encuentran.

Otro mecanismo importante de regulación es el que ejercen los diferentes reguladores negativos de la vía, encargados de bloquear la transmisión de la señal. La inactivación de las proteínas RAS por proteínas activadoras de la actividad GTPasa, como NF1, favorece la ruptura del enlace fosfodiéster del GTP a GDP; impidiendo la activación de las proteínas RAF.

Además, es conocido que en casos de activación sostenida se produce un incremento en la expresión de las fosfatasas duales específicas (DUSP, Dual-specificity phosphatase), encargadas de defosforilar a ERK. Estas están divididas en diferentes familias en función de su homología de secuencia; y repartidas entre el citoplasma y el núcleo, aumentando el grado de diversificación de la señal.

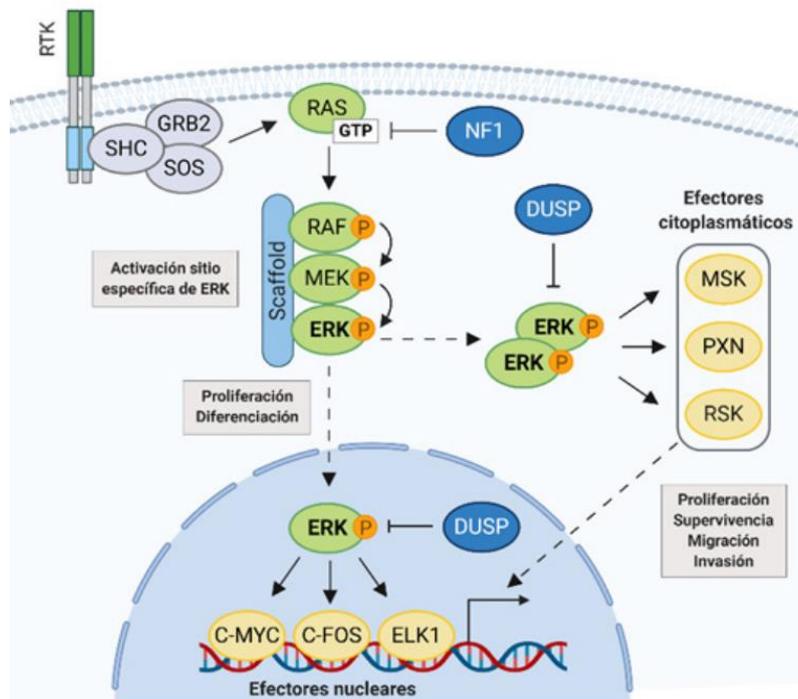


Figura 4. Activación de la vía RAS-ERK. Representación del mecanismo de activación de la vía RAS-ERK. Los efectores MAPK (en verde) transmiten la señal extracelular desde el receptor tirosina quinasa activo hasta a sus dianas citoplasmáticas y nucleares (en amarillo), a través de ERK y de su unión a proteínas scaffold. En azul oscuro, los principales reguladores negativos de la vía y en gris las proteínas encargadas de la activación de RAS. Las flechas continuas representan activación; las discontinuas, cambios en localización de la proteína y las truncadas, inactivación. (Casar et al., (2008)).

3.7 Efectos de la administración de surfeno antagonista de glucosaminoglicanos sulfatados.

Surfen (*bis* -2-metil-4-amino-quinolil-6-carbamida) se describió por primera vez en 1938 como excipiente para la producción de insulina de depósito. Se ha demostrado que surfen se une a heparinas de bajo peso molecular y al HS y otros GAG. La unión neutraliza la capacidad de las diversas heparinas para activar AT e inactivar el Factor Xa. Surfen también bloquea la sulfatación y la degradación de las cadenas GAG *in vitro* y altera las respuestas celulares dependientes del HS, como la unión y activación del factor de crecimiento, la unión celular, la infección viral por HSV y la angiogénesis. Estas observaciones ilustran la capacidad de una molécula pequeña para interferir directamente con los procesos biológicos clave que involucran al HS y sugieren la posibilidad de diseñar agentes más selectivos para identificar interacciones específicas entre el HS y la proteína. (Schuksz, M., et al., (2008)).

4. OBJETIVOS

La acumulación de glucosaminoglicanos, en concreto de dermatán sulfato que se da en el síndrome de Maratoux-Lamy se relaciona con alteraciones en las rutas de FGF y MAPK quinasa por ello los objetivos principales que se plantean en este estudio serán:

- Se llevarán a cabo dos tratamientos a partir de fibroblastos en cultivo de pacientes con MPS VI y controles: uno consiste en la adicción de FGF a distintos tiempos (0, 15 y 60 minutos); el segundo tratamiento se llevará a cabo mediante la adicción de surfeno durante 48 horas y se comparará con el cultivo sin el mismo.
- Se medirán los niveles de dos proteínas: MAPK quinasa reguladora de la señal extracelular (ERK) y MAPK quinasa reguladora de la señal extracelular fosforilada (p-ERK) tomando como control positivo vinculina y se comprobarán si hay cambios a nivel morfológico en las células en cultivo.
- Se medirá la expresión del gen *FGFR1* en pacientes con mucopolisacaridosis tipo VI y se comparará con la expresión en pacientes control.

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivos celulares

Las diferentes líneas celulares de fibroblastos humanas fueron crecidas en medio DMEM (medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS Fetal bovine serum), 1% de L-glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina. Para poder llevar a cabo el estudio se realizaron pases de cultivo de células seriados, hasta obtener una densidad de células óptimas, una placa de 150 mL de la línea control y la línea paciente. Todo esto lo realizamos en campana de cultivo y en condiciones estériles. Partimos de dos placas de 10mL de fibroblastos en cultivo, de pacientes con MPS VI y de controles. Para realizar el pase de células comenzamos atemperando el medio DMEM a 37°C para su posterior uso. Retiramos el medio en el que se encuentran inicialmente las células, sin tocar el centro, y realizamos un lavado con tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente se añadió 1mL de tripsina para levantar las células adheridas a la placa y se dejó a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo y con el fin de levantar la mayor cantidad de células posibles se rascó la placa con una punta de pipeta. Una vez realizado esto se añadió 1mL de medio DMEM para parar la reacción de la tripsina y

se rellenó el resto de la placa con el mismo medio. Cada pase de células se realizó cuando las placas se encontraron con un 60-70% de confluencia observadas mediante microscopía óptica.

Una vez obtuvimos la confluencia óptima de ambas placas pasamos las células a una placa de 6 pocillos y en cada pocillo debía haber la misma cantidad de estas. Comenzamos retirando el medio y añadiendo 2mL de tripsina y 2mL de medio a cada placa. Después cogimos esos 4mL de cada placa, los añadimos a un falcon de 15mL (uno por placa) y centrifugamos durante 5 minutos a 400g. Pasado este tiempo recogimos el precipitado que serán nuestras células y resuspendimos en 1mL de DMEM. Para contar la cantidad de células hicimos uso del contador de células automatizado Countess™ 3 cogiendo 10 μ L de cada solución de DMEM y células y añadiéndolos en un portaobjeto con cámara Countess desechable.



Figura 5: contador de células automatizado Countess 3 un sistema de recuento de células de sobremesa equipado con un algoritmo avanzado de aprendizaje automático, óptica robusta, enfoque e iluminación totalmente automatizados y software de análisis de imágenes para la evaluación rápida de muestras de células primarias e inmortalizadas.

Obtuvimos una cantidad de células de control de 3.81×10^6 cél/mL y una cantidad de células de paciente con MPS VI de 1.12×10^6 cél/mL En el caso de las células control añadimos 2.8 mL más al falcon de 15 mL para obtener una densidad de células de 1×10^6 cél/mL. En el caso de células de paciente si en 1mL obtenemos 1.12×10^6 células para obtener 1×10^6 células en 1mL debemos añadir 120 μ L de la solución de células. Como el volumen de la placa de 6 pocillos es de 1.5 mL debemos añadir 300 μ L de la solución de células control y 187 μ L de la solución de células de paciente a cada pocillo.

5.2 Tratamientos con surfeno y FGF

En el síndrome de Maratoux-Lamy la sobreproducción o acumulación anormal de GAGs puede contribuir al empeoramiento de los síntomas característicos de esta enfermedad. En este contexto, la búsqueda de terapias dirigidas específicamente a los GAGs se ha convertido en un enfoque prometedor para el tratamiento de estas enfermedades. El surfeno ha surgido como un potencial antagonista de los GAGs debido a su capacidad para interactuar con estos polímeros y modular su actividad biológica. Presenta propiedades únicas que lo convierten en un candidato ideal para la inhibición de los GAGs en células de cultivo. Su estructura plana y su alta relación superficie-volumen permiten una interacción eficiente con los GAGs, alterando su estructura y función.

Además, puede interaccionar con grupos químicos específicos que mejoran su afinidad por los GAGs y optimizan su capacidad antagonista. Al aplicar el surfeno como antagonista de los GAGs en células de cultivo, se espera observar efectos beneficiosos en términos de la regulación de procesos celulares asociados a estas enfermedades. Estos incluyen la inhibición de la adhesión y migración celular descontroladas, la reducción de la inflamación y la modulación de las interacciones intercelulares anómalas.

Por su parte el FGF tiene la capacidad de estimular la proliferación y supervivencia celular, así como de promover la diferenciación y regeneración de tejidos. En el contexto de la MPS VI, la aplicación de FGF en células de cultivo de pacientes podría tener un impacto positivo en varios aspectos de la enfermedad. Se espera que el FGF tenga la capacidad de promover la degradación y metabolismo de los GAGs acumulados, ayudando así a reducir la carga de estos compuestos en los tejidos. Además, el FGF puede estimular la proliferación y diferenciación celular de las células afectadas, lo que podría mejorar la función y la homeostasis tisular.

El tratamiento con surfeno se realizó en las dos placas de células en cultivo de pacientes con MPS VI y controles, mencionados anteriormente. Para ello partimos de un stock de surfeno 2mM y añadimos 11,25 μ L de surfeno a tres de los

pocillos de cada placa, para poder obtenerlo a una concentración de 15 μ M en un volumen final de 1.5mL perteneciente a cada pocillo. Una vez añadido el volumen se dejaron las células con surfeno durante 48 horas, revisando si existían cambios en la morfología de las células. Pasado el tiempo de incubación con surfeno se realizó el tratamiento con FGF. Antes de esto fue necesario retirar el medio de los pocillos y añadirle 1.5mL de nuevo medio DMEM. A continuación, se añadió un volumen de 1.5 μ L de FGF a cada pocillo a diferentes tiempos, durante 0, 15 y 60 minutos. Se añadió FGF a todos los pocillos de ambas placas, control y paciente, tanto en los pocillos tratados con surfeno como en los no tratados.

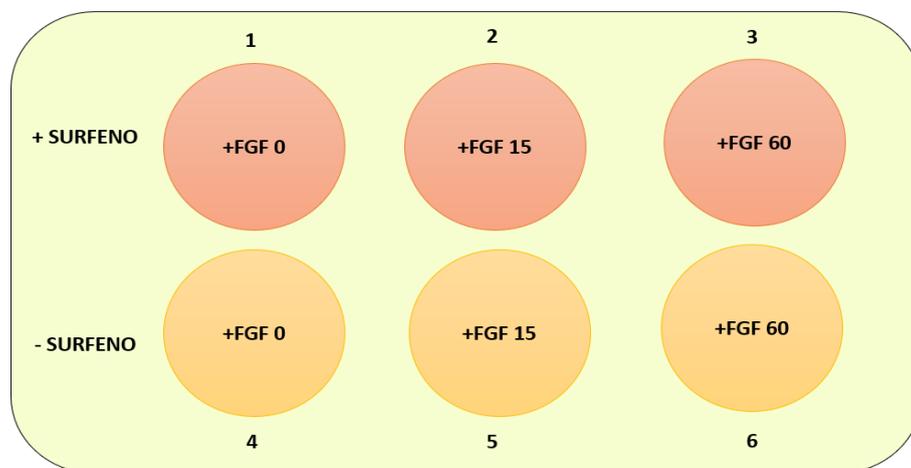


Figura 6: Esquema de placa de 6 pocillos correspondiente a células de paciente con MPS VI y control, mostrando la adición de los diferentes tratamientos por pocillo.

5.3 PCR cuantitativa o PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa (qPCR) es una de las técnicas más comunes para la cuantificación de moléculas de ácido nucleico en muestras biológicas y ambientales basándose en el uso de sondas fluorescentes. Entre las características principales de la técnica se encuentran la detección del producto en cada ciclo, el análisis de la cinética de la reacción, junto con una alta sensibilidad, especificidad y rapidez.

En este caso ya partimos de cDNA de paciente con MPS VI y control. Para amplificar el gen de estudio, FGFR1, se hizo uso de primers (Forward y Reverse), un buffer de trabajo con los cofactores necesarios y dNTPs, Taq DNA polimerasa y generalmente una sonda específica, el colorante SYBR Green, que se une al surco

menor de ADN bicatenario, para potenciar enormemente la fluorescencia. Además, fue necesario tener un gen referente que se mantenga constante a pesar de las condiciones del experimento que nos sirva para normalizar el gen de interés, en este caso utilizaremos GAPDH. La secuencia de los primers utilizados son los siguientes:

FGFR1 R= 5'-CGG TCA AAT AAT GCC TCG GG-3'

FGFR1 F= 5'-TGG CCT CCA AGA AGT GCA TA-3'

GAPDH R=5'-AGG GAT CTC GTC CCT GGA AF-3'

GAPDH F= 5'-AAT TCC ATG GCA CCG TCA AG-3'



Figura 7: materiales utilizados para la realización de qPCR eppendorf que contienen los primers (GAPDH y FGFR1), junto con muestra de cDNA en bandeja de hielo.

Comenzamos preparando en un eppendorf el mix de primers, los cuales serán de FGFR1 para ver su expresión y GAPDH como control. Partimos de 12 muestras y 2 mix de primers, uno de FGFR1 y otro de GAPDH. Por cada muestra añadimos 5 μ L de SYBR Green, 2 μ L de mix de primers , 2 μ L de H₂O, 1 μ L de cDNA y se carga la placa. Antes de colocar la placa en el dispositivo de análisis se centrifugó durante 1 minuto hasta conseguir 1000 rev. Para llevar a cabo la amplificación se hizo uso del dispositivo QuantStudio 3, diseñando la placa de análisis en su software asignado. Partimos de un volumen de reacción de 10 μ L, una temperatura de cubierta de 105°C y 50 ciclos.

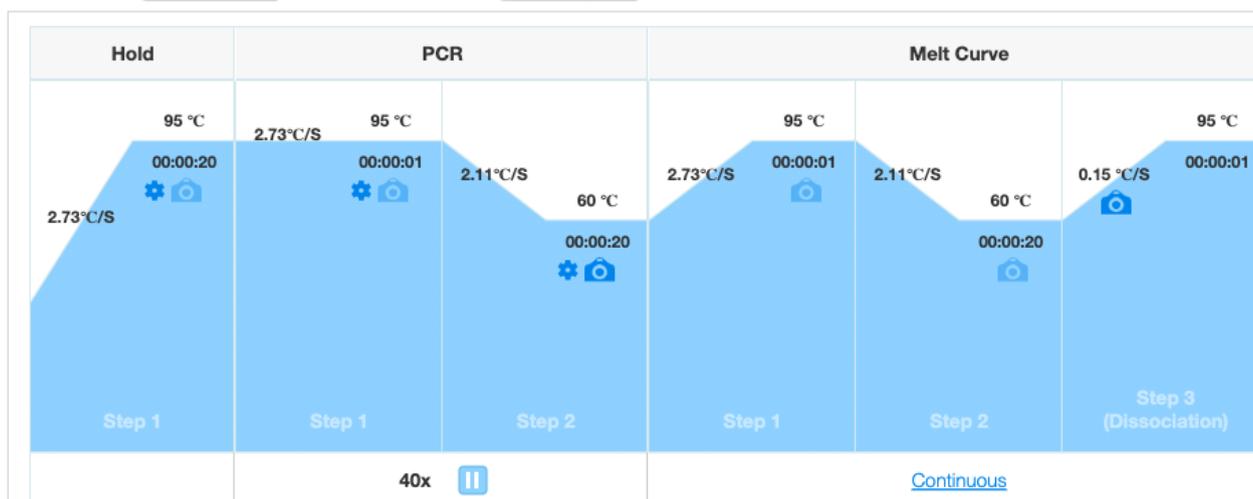


Figura 8: programa de análisis de qPCR de la casa comercial ThermoFisher. Se muestran las condiciones de estudio: volumen de reacción de 10 μ L, una temperatura de cubierta de 105°C y 50 ciclos. Además, aparece la temperatura y duración de cada paso.

Una vez establecidos los parámetros cargamos la placa en el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 3, asegurándonos que la placa está correctamente colocada y tiene dispositivos de contrapeso adecuados.

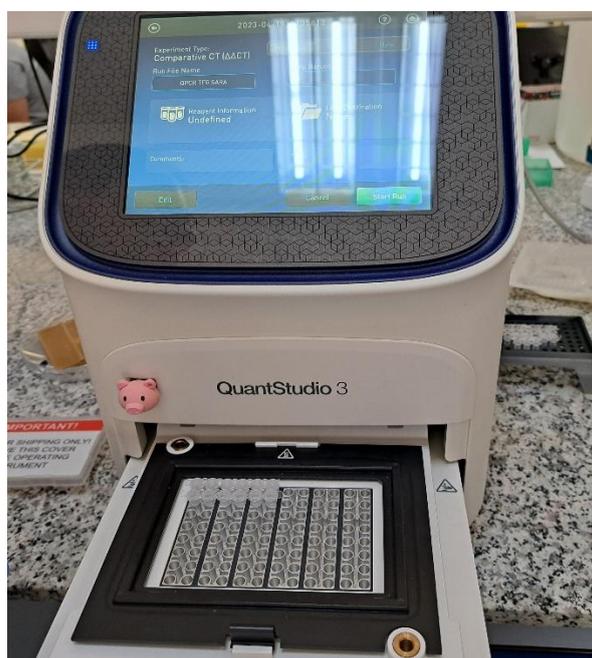


Figura 9: sistema de cuantificación de PCR en tiempo real QuantStudio 3 junto con muestras a analizar en placa de análisis. Laboratorio del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Extremadura.

5.4 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas comenzamos añadiendo 200 μ L de lisis buffer por pocillo, gota a gota, por toda la placa. Se realizó una disolución madre de lisis buffer con un volumen final de 3mL para poder cubrir las dos placas. La disolución madre estaba formada por 1.5mL de tampón salino 2X, 35 μ L de un inhibidor de fosfatasas que es el ortovanadato sódico 10mM, 120 μ L de inhibidor de proteasas, 3 μ L de β -mercaptoetanol y 1.347 mL de H₂O destilada. Una vez adicionado el tampón de lisis a cada pocillo con la placa en hielo, se rascó con un scraper y la disolución se pasó a un eppendorf, uno por placa, que se colocó también en hielo recubierto con Parafilm.



Figura 10: placa de fibroblastos en cultivo junto con lisis buffer en hielo, utilizando el utensilio scraper para remover el fluido de todos los pocillos de la placa en el laboratorio del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Extremadura

Posteriormente se colocó en la noria a 4°C durante 1 hora para que las muestras se homogenicen y las células se lisen completamente. Pasado este tiempo centrifugamos las muestras durante 20 minutos a 4°C. Durante este tiempo se calentó el termo bloque a 95°C. Una vez las muestras son centrifugadas se recogió el sobrenadante y se pasó a un nuevo éppendorf. Finalmente, para desnaturalizar el resto de las proteínas añadimos tampón 5X y las colocamos 5 minutos en el termo bloque que había sido calentado previamente a 95°C.

5.5 Método Bradford

El método de Bradford se basa en la cuantificación de los cambios de color en una solución debidos a la unión -en condiciones ácidas- de las moléculas proteicas de una muestra con las moléculas de un tinte especial: el azul de Coomassie Brilliant Blue G250. Dicha técnica la realizamos para determinar la cantidad de proteína que se necesitaba usar para realizar la técnica de Western Blot de fibroblastos de células humanas (Bradford MM, 1976).

Curva patrón: En primer lugar, se descongeló el Stock de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA a temperatura ambiente y se añadieron los volúmenes siguientes de H_2O destilada y BSA a cada pocillo. Una vez añadidos, colocamos 1 μL de cada muestra en cada pocillo, en el orden en que se muestra en la tabla X.

μL BSA	μL H2O
0	160
1	159
2	158
4	156
6	154
8	152
10	150

Tabla 2: volumen de BSA y de H_2O destilada en μL para la preparación de la muestra patrón.

Preparamos la placa de 96 pocillos y añadimos 160 μL de la mezcla de H_2O y BSA para el blanco (x3 por réplica técnica en columna) y seguidamente 1 μL de cada muestra patrón de menor a mayor (x3 por réplica técnica en columna). Sacamos el azul de Comassie de 4 $^{\circ}\text{C}$ en un falcon de 50mL y añadimos $\frac{1}{4}$ aproximadamente. Con pipeta p100 pipeteamos 40 μL de Comassie en cada uno de los pocillos, con cuidado de no generar burbujas.

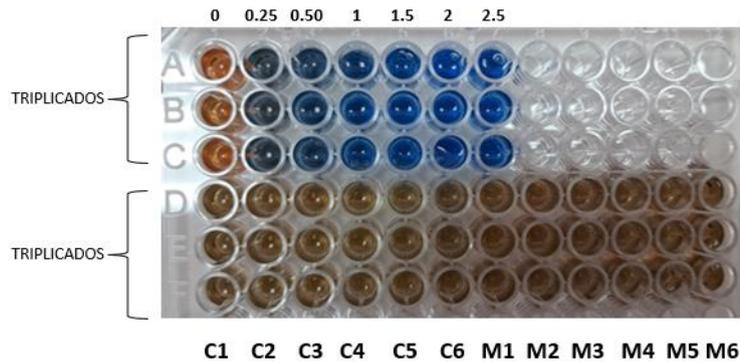


Figura 11. Placa de 96 pocillos con coloración en 57 pocillos, numerados de 0 a 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y de C1 a M6 por triplicados, siendo C las muestras control y M las muestras de pacientes con mucopolisacaridosis tipo VI.

Lectura absorbancia: para este proceso utilizamos el espectrofotómetro lector de microplacas Infinite F50 Robotic con cubeta. La longitud de onda debe ser de 595nm, propio de las proteínas. El análisis se realizó mediante el software Magellan for F50.

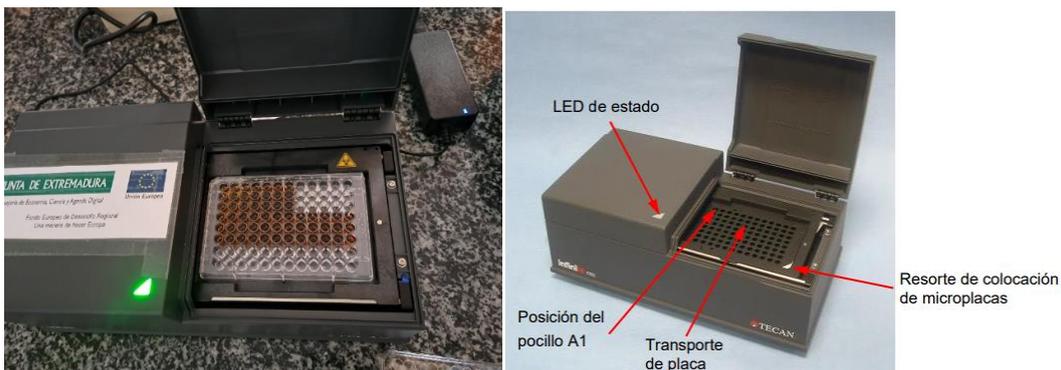


Figura 12 y 13: Espectrofotómetro lector de microplacas Infinite F50 Robotic con y placa de 96 pocillos. En la imagen de la derecha se muestran los componentes del instrumento entre los que se encuentran un LED que te informa del estado y el resorte de colocación de la microplaca.

5.6 SDS-PAGE

La electroforesis es un método analítico en el que se separan biomoléculas según su carga y bajo la acción de un campo eléctrico; fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937. La velocidad de migración de las partículas también depende del tamaño y la forma de estas; y del coeficiente de fricción que presente el soporte en el que se realiza. El objetivo principal de este experimento consiste en el desarrollo de la técnica de electroforesis SDS-PAGE para estimar el peso molecular

de distintas muestras proteicas y compararlo con los valores que brinda la teoría y con estas 3 comparaciones, concluir cuán preciso y eficiente es esta técnica para el análisis de proteínas.

Preparación de los geles: El gel de apilamiento y el gel de resolución son dos tipos de geles de poliacrilamida que se utilizan para lograr una mejor separación de las proteínas en cada muestra. Estos dos geles difieren en el pH, el contenido de poliacrilamida, el tamaño de los poros y el propósito final. En primer lugar, se realiza el gel de resolución (Resolving gel) en nuestro caso lo hicimos con un porcentaje del 10% con un volumen final de 10mL. Usamos 4.84 mL de agua milliQ, 2.5 mL de Acrilamida al 40%, 2.5 mL de Tris-HCl 1,5M de pH 8.8, 100µL de duodecilsulfato de sodio (SDS) 10%, 10 µL de Tetrametiletilendiamina (TEMED) y 50 µL de Amonio Peroxodisulfato (APS) 10%.

Seguidamente volcamos el volumen del gel de resolución entre los vidrios del soporte y se añadió con una pipeta Pasteur una capa de isopropanol de 3cm de alto para aislar del aire y evitar burbujas. Se dejó en reposo por 10min para la polimerización del gel y transcurrido el tiempo se eliminó la capa de isopropanol evitando que quede cualquier resto. Posteriormente se realizó el gel de acumulación o apilamiento (stacking gel), que alinea las proteínas en una fina banda que entra al mismo tiempo y velocidad en el gel separador, usando un volumen final de 5 mL añadimos 3.16mL de agua milliQ, 500 µL de Acrilamida al 40%, 1.26 mL de TrisHCL 0,5M de pH 6.8, 50 µL de duodecilsulfato de sodio (SDS) 10%, 10 µL de Tetrametiletilendiamina (TEMED) y 25 µL de Amonio Peroxodisulfato (APS) 10%. Una vez que tenemos todos los compuestos añadidos vertimos el volumen del gel entre los vidrios, luego se colocó lentamente el peine con los dientes más gruesos hacia el gel y se dejó en reposo por 20min para que se solidificara. Transcurrido el tiempo se retiró lentamente el peine y se limpiaron los pocillos con agua destilada para que no quedaran restos de acrilamida y poder a su vez retirar las burbujas.

Preparación de las muestras: Calcular la cantidad de tampón de carga y β -

mercaptoetanol que debemos añadir a cada muestra y pipetear el MIX en cada endorff. Para las muestras se usaron 117 μ L de tampón de carga y 0.375 μ L de β -mercaptoetanol. Una vez pipeteado se colocaron en el termobloque a 95-100°C durante 5 min. Posteriormente se realizó un SPIN de centrifuga durante 9 segundos y se cargaron los geles. Mientras tanto se preparó el running Buffer 1X: 900ml H₂O destilada +100ml de Tris Glicina 10X SDS.

Electroforesis: A continuación, se preparó la cubeta de electroforesis vertical, se encajaron los geles y se acabó de llenar la cubeta con Running buffer. Pusimos una placa de hielo en la cubeta para mantener la temperatura ya que al elevar el voltaje la temperatura del medio aumenta y puede ocasionarnos errores. Hecho esto se aplicó corriente al gel a 60 V comprobando que la corriente pasa correctamente, observando que las burbujas aparecían al conectar el voltaje, hasta que las muestras se empaqueten. Posteriormente se fue subiendo el voltaje durante 2 horas.

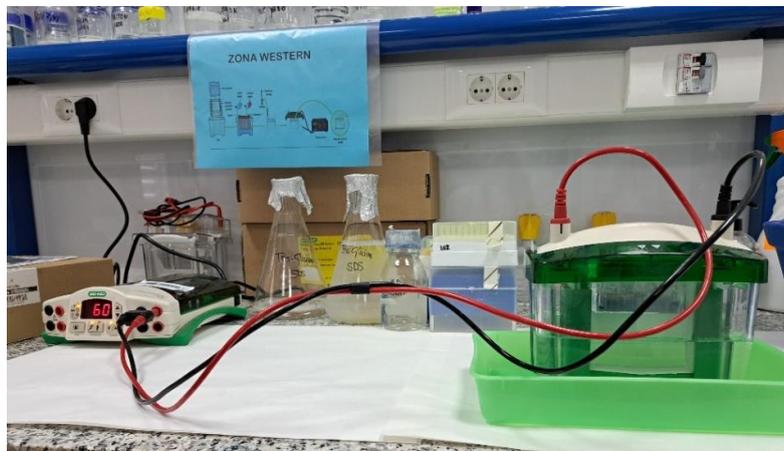


Figura 14. Laboratorio Área Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Extremadura fuente de voltaje y cubeta de electroforesis conectadas a 65 voltios.

5.7 Western Blot

La técnica Western blot se utiliza a menudo en la investigación para separar e identificar proteínas. En esta técnica se separa una mezcla de proteínas en función del peso molecular y, por tanto, del tipo, mediante electroforesis en gel. Estos

resultados luego se transfieren a una membrana que produce una banda para cada proteína. A continuación, la membrana se incuba con anticuerpos marcadores específicos de la proteína de interés. El anticuerpo no unido se lava dejando solo el anticuerpo unido a la proteína de interés. A continuación, los anticuerpos unidos se detectan revelando la película. Como los anticuerpos solo se unen a la proteína de interés, solo debe verse una banda. El grosor de la banda corresponde a la cantidad de proteína presente; por lo tanto, hacer un estándar puede indicar la cantidad de proteína presente (Mahmood T, & Yang PC., 2012).

Electrotransferencia: Una vez finalizada la electroforesis sacamos el gel y cortamos la parte sobrante (stacking gel) para poder hacer la transferencia a la membrana de nitrocelulosa. Cortamos 4 papeles de filtro para adaptarse a la medida del gel y 1 membranas de fluoruro de polivinilideno (PDVF) y a continuación se humedecieron las esponjas, papeles de filtro y membrana con el tampón de transferencia o transfer buffer: Tris Glicina 1X+ 20% Metanol.

Posteriormente montamos el sándwich de transferencia en el orden siguiente: espuma-papel de filtro-gel-membrana-papel de filtro-espuma. Después de cada paso eliminamos las burbujas para que no interfieran con el resultado.

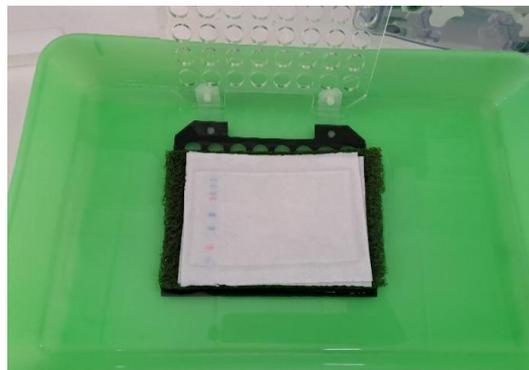


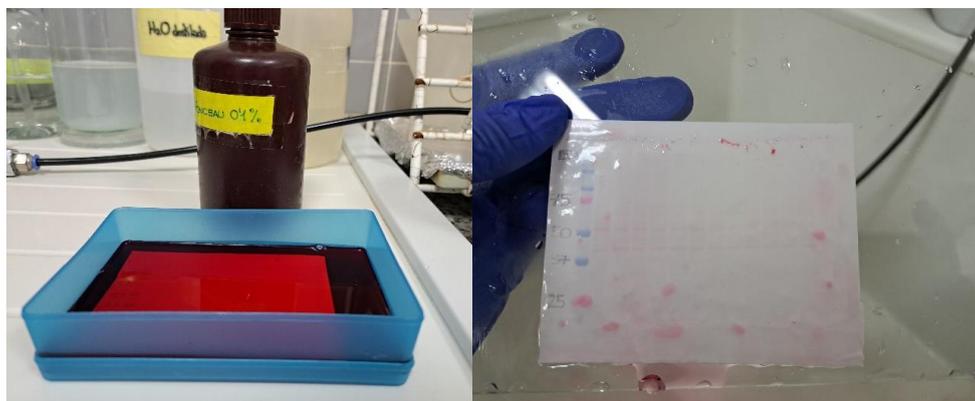
Figura 15. Laboratorio Área Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Extremadura cubeta perteneciente a la realización de la técnica Western Blot junto con sándwich y transfer buffer en la bandeja de montaje.

Se colocó el sándwich en la cubeta está rodeada de hielo y se puso en marcha el agitador en cámara a 4°C a velocidad 4-5. Lo conectamos a 333,33mA durante 3 horas.



Figura 16. Laboratorio Área Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Extremadura cubeta perteneciente a la realización de la técnica Western Blot junto con sándwich y transfer buffer con bloque de hielo.

Acabado este tiempo se abrió el sándwich con la parte negra abajo, colocamos la membrana boca arriba y se añadió el colorante Ponceau (colorante rojo que se une especialmente bien a las proteínas). A continuación, se realizaron 3 lavados con agua destilada y se mantuvieron las muestras en esta. Se recortaron los márgenes de membrana que no contienen muestra, dividimos la membrana en 2 fragmentos p-ERK y vinculina; ERK totales y vinculina.



Figuras 17 y 18: Laboratorio Área Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Extremadura membrana después de la transferencia en cubeta con Ponceau y después de los lavados con agua destilada.

Bloqueo e incubación de anticuerpos: Una vez separadas las muestras en una cajeta se añadieron 2mL de Blocking buffer (5g de leche diluidos en 100mL de TBS-T) a cada una para bloquear las membranas y se colocaron en el balanceador durante 1 hora. Mientras tanto se prepararon los anticuerpos primarios. Pasado el tiempo de bloqueo se añadieron los anticuerpos primarios en la parte superior o inferior de la membrana y se dejaron toda la noche a 4°C en agitación o a 4°C en

agitación durante 5 horas. Trascurridos estos tiempos de espera devolvimos los anticuerpos primarios a un eppendorf para poder utilizarlos en otra ocasión. A continuación, se realizaron 5 lavados con TBS-Tween 0.1% 1X de 7 minutos cada uno, colocando las placas en la zona de balanceo, para retirar los restos de anticuerpo. Posteriormente se añadieron los anticuerpos secundarios en Blocking Buffer (5g de leche diluidos en 100mL de TBS-T) utilizando para este caso un volumen final de Blocking Buffer de 2mL para las dos mezclas con los anticuerpos secundarios, añadiendo 1 μ L del anticuerpo secundario de rabbit (1:1000) por una parte y 0.5 μ L de anticuerpo secundario de mouse (1:1000) que son utilizados con la misma titulación en todos los Western Blot realizados. Los anticuerpos secundarios los mantuvimos 1 hora e hicimos 4 lavados de 7 minutos con TBS-Tween 0.1% 1X al igual que con el anticuerpo primario, en el balanceador, y un último lavado de 7 minutos con TBS 1X.

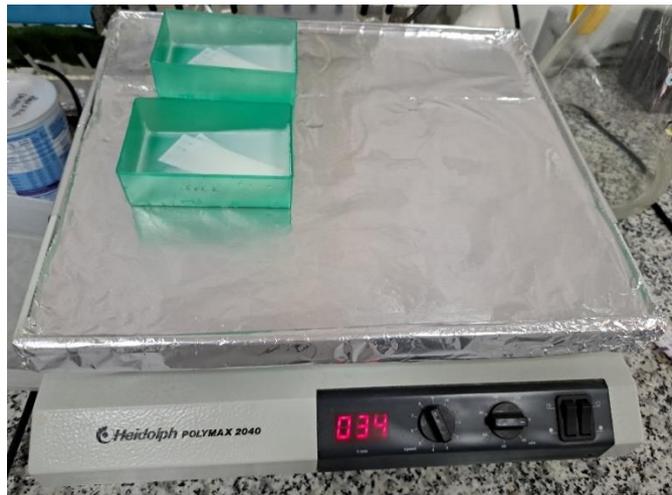


Figura 19: Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Extremadura membranas tras la realización de lavados en el balanceador

Una vez transcurrido el tiempo cogimos las membranas, las metimos en la solución de TBS-Tween 0.1-1x y las transportamos a la máquina de revelado (Chemi Blod) donde comprobamos los resultados, ayudándonos de Thermo Scientific SuperSignal West Femto un sustrato quimioluminiscente (ECL). La quimioluminiscencia mejorada o ECL se ha convertido en el método más popular para la detección en el análisis de transferencia Western, aunque han surgido nuevas detecciones y se están desarrollando otras (MacPhee D. J. (2010)). Es un método muy sensible y se puede utilizar para cuantificar la abundancia relativa de

una proteína o proteínas de interés, a diferencia de los anticuerpos marcados con enzimas que utilizan sustratos solubles que se convierten en productos finales coloreados insolubles (Kurien y Scofield, 2006). El principio es que cuando un sustrato como el 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona (luminol) se oxida con peróxido de hidrógeno, se libera luz durante la reacción química. El sustrato es, por lo tanto, un reactivo limitante y la producción de luz termina cuando el sustrato se oxida. Cuando un procedimiento Western se optimiza correctamente el rango de respuesta lineal de la reacción de ECL, durante un determinado período de tiempo, ayudará a cuantificar los niveles relativos de proteína (siguiendo la proporción de solución A y B proporcionada por el fabricante), en una proporción de 1mL de cada uno de los botes, van por orden: primero extraemos el 250 μ L del bote de color claro y en segundo lugar del bote de color oscuro, a este último no le puede dar la luz, o si le da que sea lo menos posible.



Figuras 20 y 21: A la izquierda recipientes para preparar la mezcla ECL. A la derecha se aprecia el uso de casete para exponer la membrana en el cuarto de revelado.

A continuación, se añadió la mezcla de ECL a cada una de las muestras, las colocamos en la máquina de revelado y finalmente se obtuvieron los resultados.



Figura 22. Máquina de revelado iBright CL1500 Imaging System área Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Extremadura.

Condiciones de Western Blot realizado en humanos. Partimos de un extracto proteico de 20 μ g, los cuales usamos para analizar y resolver las demás proteínas mediante electroforesis SDS/PAGE e inmunotransferencia con los siguientes anticuerpos primarios: 1 μ L p-ERK, 0.5 μ L Vinculina y 1 μ L ERK-total. Todos los anticuerpos primarios los bloqueamos con un 5% de leche (5g de leche en 100mL de TBS-T). La cuantificación densitométrica se realizó utilizando el software ImageJ en determinaciones independientes por duplicado.

5.8 Stripping

Para la mayoría de las inmunotransferencias desarrolladas con quimioluminiscencia o con sistemas de detección basados en fluorocromos, es posible eliminar los anticuerpos primarios y secundarios de la membrana sin afectar el antígeno unido. Esta técnica te permite reutilizar la membrana para la detección de otro antígeno proteico y recibe el nombre de Stripping. (Litovchick L. 2020). En nuestro caso utilizamos esta técnica para la optimización de los anticuerpos primarios p-ERK y ERK-total, ya que las señales obtenidas no se relacionaban con lo esperado. Antes de añadir la solución de stripping se realizaron 3 lavados de 7 minutos con TBS-Tween 1X. Durante este tiempo preparamos el Stripping Buffer usando un volumen final de 100mL añadimos: 1mL de Tween 1%, 0.1 g de SDS, 1.5 g de Glicina y H₂O destilada aforando hasta el volumen final. A continuación, se incubaron las membranas con el stripping buffer a temperatura ambiente durante 2 horas y agitación lenta. Una vez finalizado el tiempo se realizaron 2 lavados con

PBS 1X de 10 minutos y 2 lavados con TBS-Tween de 5 minutos. Finalmente, se llevó a cabo el protocolo de Western Blot de adición de anticuerpos primarios. En nuestro caso, dejamos guardadas las membranas en TBS 1X O.N y comenzamos realizando un lavado con TBS-Tween de 7 minutos, dando paso al bloqueo.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto del surfeno en la morfología y viabilidad celular en cultivo de fibroblastos de pacientes con MPS VI y control.

Uno de los enfoques terapéuticos para tratar las MPS y en concreto MPS VI de la que es objeto nuestro estudio podría ser el uso de surfeno, que se ha demostrado prometedor en estudios preclínicos. Sin embargo, antes de ser considerado como opción terapéutica segura y efectiva es crucial evaluar su impacto

en la viabilidad celular y en la morfología de los cultivos celulares. Además, es fundamental comparar estos efectos con cultivos de fibroblastos obtenidos de pacientes control, que no presentan la condición de MPS VI. Por ello, lo primero fue determinar si el surfeno tenía algún efecto perjudicial sobre las células en ambos grupos, para ello se hicieron controles seriados de visualización a microscopía electrónica de los distintos grupos. Los resultados obtenidos revelaron que el surfeno no afecta significativamente a la viabilidad celular ni a la morfología de los cultivos de fibroblastos de pacientes con MPS VI ni pacientes control, teniendo en cuenta que la confluencia del cultivo de fibroblastos en pacientes es menor dado que estas células tienen un tiempo de crecimiento más lento.

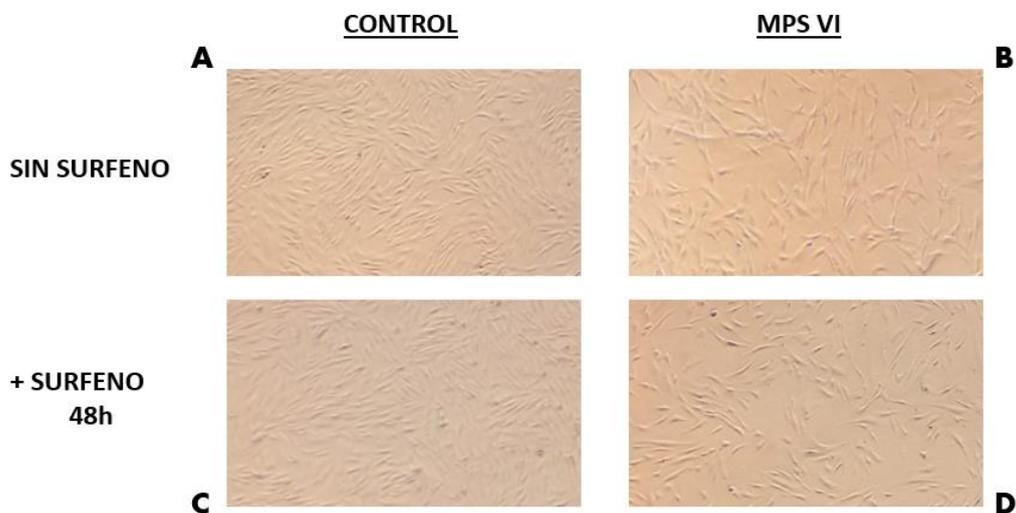


Figura 23. Imágenes de cultivo de fibroblastos a microscopía electrónica con aumento 20X en pacientes con MPS VI y pacientes control, sin tratar y tratados con surfeno durante 48 horas. Si comparamos las muestras de cultivos control (panel A y C) y las muestras de pacientes con MPS VI (panel B y D) con y sin surfeno no se aprecia una disminución de la viabilidad ni cambios a nivel morfológico.

Si se aprecian diferencias de confluencia entre los cultivos de fibroblastos de pacientes con MPS VI con y sin surfeno (paneles B y D) frente a la confluencia de células control (paneles A y C), esto es debido a que el crecimiento de las células con la enfermedad es más lento que en células control.

Con estos resultados **se proporciona la evidencia preliminar que respalda la seguridad del surfeno en cultivos de fibroblastos en pacientes con MPS VI, sin afectar la viabilidad celular ni la morfología.**

6.2. Comparación de los niveles de expresión de p-ERK y ERK total entre cultivos de fibroblastos de pacientes con mucopolisacaridosis tipo VI y

cultivos de fibroblastos de pacientes control tratados con FGF y surfeno.

La mucopolisacaridosis tipo VI (MPS VI) es una enfermedad metabólica hereditaria caracterizada por la deficiencia de la enzima arilsulfatasa B, lo que resulta en la acumulación de glucosaminoglicanos en los tejidos y órganos del cuerpo. Esta acumulación anormal puede provocar diversas complicaciones clínicas en los pacientes afectados. En estudios previos, se ha observado que la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia. Una de las proteínas clave en esta vía de señalización es la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK). La fosforilación de ERK (p-ERK) es un evento crucial en la activación de esta vía y está asociada con diversos procesos celulares. En este estudio, se comparan los niveles de expresión de p-ERK y ERK total entre cultivos de fibroblastos de pacientes con MPS tipo VI y cultivos de fibroblastos de pacientes control, tras realizar un tratamiento con surfeno durante 48 horas y un tratamiento con FGF a diferentes tiempos (0,15 y 60 minutos) con el objetivo de evaluar si existe alguna alteración en la activación de la vía de señalización de ERK en los pacientes con MPS tipo VI.

Nuestros estudios revelaron que los niveles de expresión de p-ERK en condiciones basales (sin ningún tipo de tratamiento) se ven notablemente aumentados en cultivos de fibroblastos de pacientes con MPS tipo VI en comparación con los cultivos de fibroblastos de pacientes control.

Además, en cultivo de fibroblastos de pacientes con MPS VI donde no se ha realizado tratamiento con surfeno y si han sido tratados con FGF durante 15 minutos, hay un pico de expresión donde se ve incrementados los niveles de p-ERK. Por su parte el tratamiento con surfeno disminuye los niveles de p-ERK en todos los tratamientos con FGF en cultivo de fibroblastos de pacientes con MPS VI. En controles no se aprecian diferencias significativas en los niveles de p-ERK respecto a ningún tratamiento, por lo que tardan más en llegar a la máxima activación, que probablemente sea después de 60 minutos.

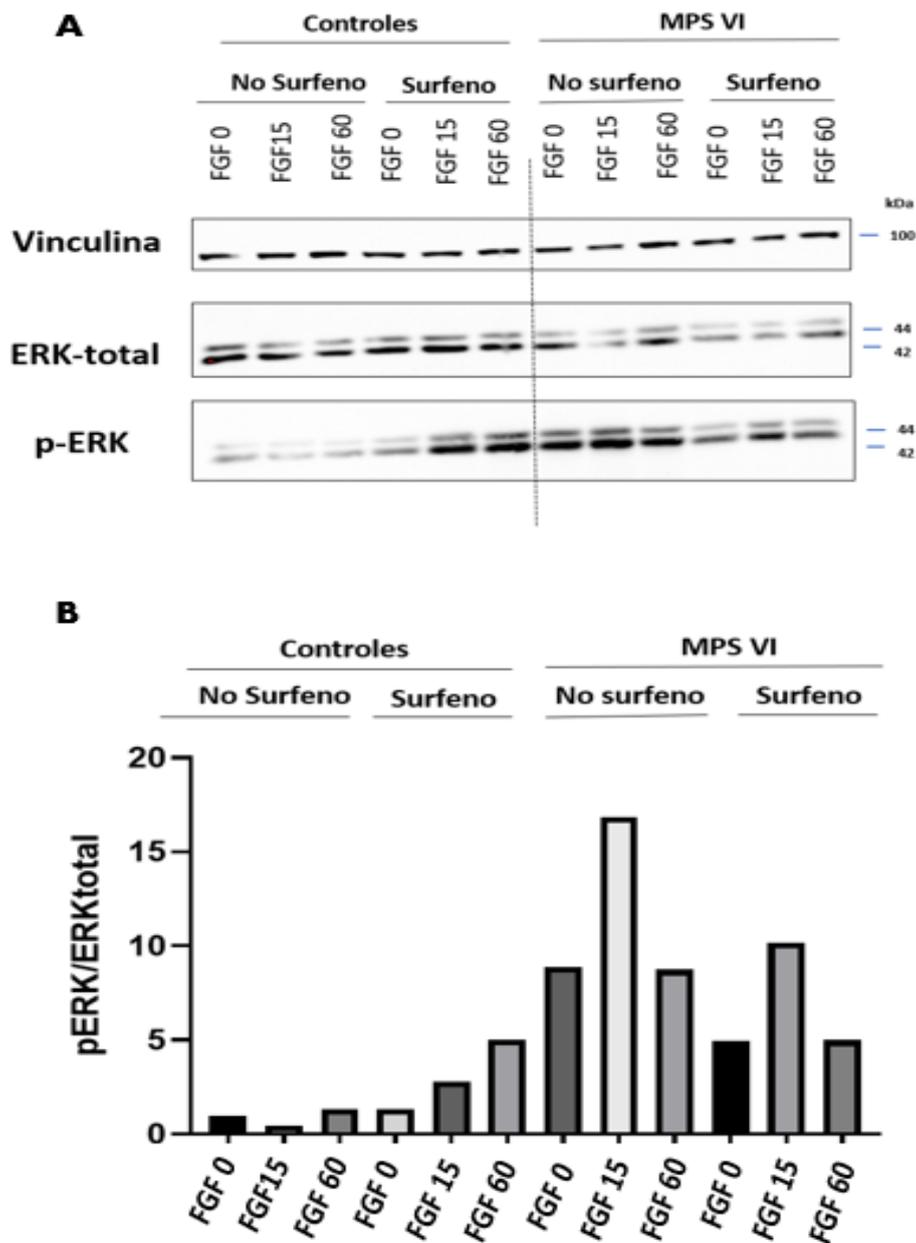


Figura 24. Los niveles de expresión de p-ERK, ERK total y vinculina en cultivo de fibroblastos con tratamiento de FGF y surfeno, de pacientes con MPS tipo VI y pacientes control se analizaron mediante inmunotransferencia para ERK, p-ERK y vinculina y se cuantificaron por densitometría. Los niveles de proteína se normalizaron a valores de vinculina y de una muestra de referencia. En el panel B se muestran los niveles de ERK total, p-ERK y vinculina normalizados a la muestra de referencia control. en este caso se observa un incremento del nivel de expresión de p-ERK en pecientes con MPS VI en niveles basales. Asimismo, se aprecia como la adicción de FGF a 15 minutos potencia la expresión de p-ERK en pacientes con MPS VI, y por el contrario, el tratamiento con surfeno disminuye la expresión de p-ERK en pacientes con MPS VI.

En conclusión, nuestros hallazgos destacan **una mayor activación de la vía de ERK**, medida mediante los niveles de p-ERK, en los fibroblastos de pacientes con

MPS tipo VI en comparación con los fibroblastos de pacientes control. Además se observa un **incremento de la expresión de p-ERK en pacientes con MPS VI mediada por la adición de FGF a 15 minutos**. Por otra parte se aprecia una **disminución de los niveles de p-ERK mediada por la adición de surfeno** en pacientes con MPS VI.

6.3. Análisis de la expresión del gen *FGFR1* en pacientes con mucopolisacaridosis tipo VI.

FGFR1, el receptor 1 del factor de crecimiento de los fibroblastos, desempeña un papel clave en la activación de la vía de señalización de las proteínas RAS y, posteriormente, en la activación de las proteínas quinasas MAP (Mitogen-Activated Protein Kinases), incluyendo a ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinases). Una vez activado, ERK se desplaza hacia el núcleo celular y fosforila factores de transcripción, como proteínas del complejo de transcripción nuclear, para regular la expresión génica. En este estudio se comprobó si hay un aumento de la expresión del gen *FGFR1* en pacientes con MPS VI, para corroborar así un aumento de los niveles de p-ERK, como se ha obtenido analizando los resultados anteriores.

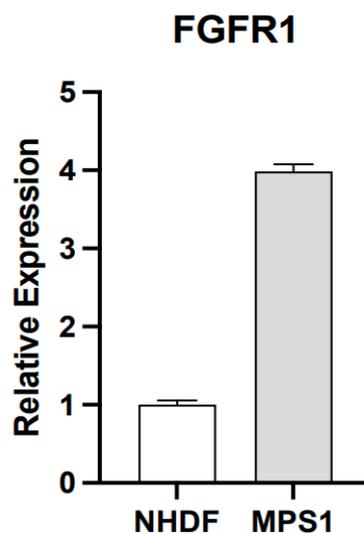


Figura 25. Los niveles de expresión del gen *FGFR1* en pacientes con MPS VI, analizados mediante PCR cuantitativa, muestran un aumento de expresión de dicho gen en pacientes con MPS tipo VI cuatro veces superior a la expresión que se observa en muestras de pacientes control (NHDF).

Como se ha obtenido un ***aumento en los niveles de expresión del gen FGFR1 es 4 veces mayor pacientes con mucopolisacaridosis tipo VI***, podemos concluir que por ello puede darse un aumento de la activación de la proteína quinasa ERK por fosforilación, obteniendo así niveles elevados de dicha proteína fosforilada en pacientes con MPS VI.

7. DISCUSIÓN

Mediante el uso de fibroblastos en cultivo de pacientes con MPS VI se pretende identificar cómo actúan diversos factores implicados en la ruta de señalización afectada, su papel relevante en esta enfermedad, así como un posible tratamiento frente a la misma. Tras un estudio realizado en pacientes control y pacientes con MPS VI aspiramos a dilucidar un posible aumento de la expresión de la proteína ERK fosforilada en pacientes con MPS VI. En esta enfermedad se produce una acumulación de dermatán sulfato, un tipo de glucosaminoglicano que puede actuar como correceptor en la ruta de factor de crecimiento de fibroblastos FGF activándola. Asimismo, esta ruta activada promueve la fosforilación de proteínas quinasa como ERK, sujeto de nuestro estudio. Esto se ha comprobado también en otro tipo celular, queratinocitos, donde se aprecia como el dermatán sulfato se une al factor de crecimiento de queratinocitos FGF-7 potenciando su actividad (Trowbridge, J. M., et al., (2002)). En nuestro caso se obtuvieron mayores niveles de expresión de proteína ERK fosforilada en pacientes con MPS tipo VI, confirmando que el dermatán podría afectar a dicha ruta sobreactivando a la proteína ERK. Para reafirmar esta hipótesis se realizó un análisis de la expresión del gen *FGFR1* donde se obtuvo como resultado un aumento de la expresión de dicho gen en pacientes con esta enfermedad. Mediante el empleo de la herramienta The Human protein atlas se pudo dilucidar que en otras enfermedades como el cáncer (de tiroides, de cabeza y cuello y cáncer de mama) también se observa un aumento de los niveles de expresión de este gen.

Como posible tratamiento diana se comprueba como afecta el efecto de surfeno en células de pacientes en cultivo ya que se sabe que este puede actuar como antagonista de los glucosaminoglicanos inhibiendo su actividad, y además se ha comprobado en otros estudios como su empleo bloquea a glucosaminoglicanos extratumorales de condritín sulfato en glioblastoma. (Logun, M. T., et al., (2019)). Obtuvimos una disminución en los niveles de expresión de p-ERK en pacientes con MPS VI corroborando nuestra hipótesis. Además, no se obtuvieron cambios en morfología ni en viabilidad celular lo que podría ser considerado como un material seguro para su aplicación en el contexto de la terapia de MPS VI.

Por otra parte, se realizaron tratamientos con FGF a diferentes tiempos para comprobar si su adición pudiera conllevar a la activación de la proteína ERK, fosforilándola. Se adicionó FGF a 0,15 y 60 minutos y se observó un máximo de expresión de p-ERK a un tiempo de 15 minutos que sería el tiempo que tardaría en llegar a su máxima activación. A pesar de haber obtenido hallazgos que corroboran nuestra hipótesis se deberían hacer más estudios para poder afirmar que el dermatán sulfato aumente la expresión de p-ERK y que surfeno pueda actuar como terapia en la enfermedad de mucopolisacaridosis tipo VI.

8. CONCLUSIÓN

En resumen, con los resultados obtenidos en nuestra investigación las conclusiones de este trabajo de fin de grado son:

1. Se proporcionan evidencias de que en pacientes con MPS VI, donde se produce una acumulación de dermatán sulfato, la expresión de la proteína quinasa ERK fosforilada se ve aumentada, debido a que el dermatán sulfato actúa como co-receptor activando la ruta de FGF que promueve dicha fosforilación.
2. Esto se observa además mediante la realización de un análisis de la expresión del gen *FGFR1* donde su expresión se ve aumentada en pacientes con enfermedad.
3. Se corrobora mediante el tratamiento con FGF a diferentes tiempos observándose un aumento de p-ERK con un pico máximo de activación tras 15 minutos de su adición, a tiempos menores que la activación que ocurre en pacientes control.
4. Con nuestros hallazgos podríamos considerar la adición de surfeno como una posible terapia para pacientes con esta enfermedad, ya que al ser un inhibidor de glucosaminoglicanos como dermatán sulfato disminuye la expresión de p-ERK tras su adición. Sin embargo, deberían repetirse nuestros estudios para poder afirmar nuestras hipótesis.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Beenken, A., & Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(3), 235–253. <https://doi.org/10.1038/nrd2792>
- Casar, B., Pinto, A., & Crespo, P. (2008). Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Molecular cell*, 31(5), 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.024>
- Casci, T., Vinós, J., & Freeman, M. (1999). Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell*, 96(5), 655–665. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80576-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80576-0)
- Catlow, K., Deakin, J. A., Delehedde, M., Fernig, D. G., Gallagher, J. T., Pavão, M. S., & Lyon, M. (2003). Hepatocyte growth factor/scatter factor and its interaction with heparan sulphate and dermatan sulphate. *Biochemical Society transactions*, 31(2), 352–353. <https://doi.org/10.1042/bst0310352>
- Cseh, B., Doma, E., & Baccarini, M. (2014). "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS letters*, 588(15), 2398–2406. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.025>
- Dudka, A. A., Sweet, S. M., & Heath, J. K. (2010). Signal transducers and activators of transcription-3 binding to the fibroblast growth factor receptor is activated by receptor amplification. *Cancer research*, 70(8), 3391–3401. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3033>
- Eswarakumar, V. P., Lax, I., & Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(2), 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.001>
- Fürthauer, M., Lin, W., Ang, S. L., Thisse, B., & Thisse, C. (2002). Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nature cell biology*, 4(2), 170–174. <https://doi.org/10.1038/ncb750>
- Giugliani, R., Federhen, A., Rojas, M. V., Vieira, T., Artigalás, O., Pinto, L. L., Azevedo, A. C., Acosta, A., Bonfim, C., Lourenço, C. M., Kim, C. A., Horovitz, D., Bonfim, D., Norato, D., Marinho, D., Palhares, D., Santos, E. S., Ribeiro, E., Valadares, E., Guarany, F., ... Martins, A. M. (2010).

Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genetics and molecular biology*, 33(4), 589–604. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572010005000093>

- Germain, D. P., Hughes, D. A., Nicholls, K., Bichet, D. G., Giugliani, R., Wilcox, W. R., Feliciani, C., Shankar, S. P., Ezgu, F., Amartino, H., Bratkovic, D., Feldt-Rasmussen, U., Nedd, K., Sharaf El Din, U., Lourenco, C. M., Banikazemi, M., Charrow, J., Dasouki, M., Finegold, D., Giraldo, P., ... Schiffmann, R. (2016). Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *The New England journal of medicine*, 375(6), 545–555. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510198>
- Hart, K. C., Robertson, S. C., Kanemitsu, M. Y., Meyer, A. N., Tynan, J. A., & Donoghue, D. J. (2000). Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. *Oncogene*, 19(29), 3309–3320. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203650>
- Kimelman, D., & Kirschner, M. (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell*, 51(5), 869–877. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90110-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90110-3)
- Kimelman, D., & Kirschner, M. (1987)) y la formación de diferentes órganos De Moerlooze, L., Spencer-Dene, B., Revest, J. M., Hajihosseini, M., Rosewell, I., & Dickson, C. (2000). An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 127(3), 483–492. <https://doi.org/10.1242/dev.127.3.483>
- Knights, V., & Cook, S. J. (2010). De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 125(1), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.10.001>
- Kobayashi, S., Boggon, T. J., Dayaram, T., Jänne, P. A., Kocher, O., Meyerson, M., Johnson, B. E., Eck, M. J., Tenen, D. G., & Halmos, B. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*, 352(8), 786–792. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044238>
- Lavoie, H., & Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK

signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(5), 281–298.
<https://doi.org/10.1038/nrm3979>

- Litjens T, Baker EG, Beckmann KR, Morris CP, Hopwood JJ, Callen DF. Localización cromosómica de ARSB, el gen de la N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana. *Hum Genet.* 1989; 82 :67–68. doi: 10.1007/BF00288275.
- Logun, M. T., Wynens, K. E., Simchick, G., Zhao, W., Mao, L., Zhao, Q., Mukherjee, S., Brat, D. J., & Karumbaiah, L. (2019). Surfen-mediated blockade of extratumoral chondroitin sulfate glycosaminoglycans inhibits glioblastoma invasion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(11), 11973–11992. <https://doi.org/10.1096/fj.201802610RR>
- (Michaud, M., Belmatoug, N., Catros, F., Ancellin, S., Touati, G., Levade, T., & Gaches, F. (2020). Mucopolysaccharidoses : quand y penser ? [Mucopolysaccharidosis: A review]. *La Revue de medecine interne*, 41(3), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2019.11.010>)
- Mohapatra, B., Ahmad, G., Nadeau, S., Zutshi, N., An, W., Scheffe, S., Dong, L., Feng, D., Goetz, B., Arya, P., Bailey, T. A., Palermo, N., Borgstahl, G. E., Natarajan, A., Raja, S. M., Naramura, M., Band, V., & Band, H. (2013). Protein tyrosine kinase regulation by ubiquitination: critical roles of Cbl-family ubiquitin ligases. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(1), 122–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.010>
- Mohammadi, M., Honegger, A. M., Rotin, D., Fischer, R., Bellot, F., Li, W., Dionne, C. A., Jaye, M., Rubinstein, M., & Schlessinger, J. (1991). A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Molecular and cellular biology*, 11(10), 5068–5078. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.10.5068-5078.1991>
- Paciotti, S., Persichetti, E., Pagliardini, S., Deganuto, M., Rosano, C., Balducci, C., Codini, M., Filocamo, M., Menghini, A. R., Pagliardini, V., Pasqui, S., Bembi, B., Dardis, A., & Beccari, T. (2012). First pilot newborn screening for four lysosomal storage diseases in an Italian region: identification and analysis of a putative causative mutation in the GBA gene. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 413(23-24), 1827–1831.

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.07.011>

- Parkinson-Lawrence, E. J., Shandala, T., Prodoehl, M., Plew, R., Borlace, G. N., & Brooks, D. A. (2010). Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(2), 102–115. <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2009>
- Penc, S. F., Pomahac, B., Winkler, T., Dorschner, R. A., Eriksson, E., Herndon, M., & Gallo, R. L. (1998). Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *The Journal of biological chemistry*, 273(43), 28116–28121. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.28116>
- Rafalski, V. A., & Brunet, A. (2011). Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Progress in neurobiology*, 93(2), 182–203. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.10.007>
- Roskoski R., Jr (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research*, 66(2), 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Simonaro, C. M., D'Angelo, M., He, X., Eliyahu, E., Shtraizent, N., Haskins, M. E., & Schuchman, E. H. (2008). Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. *The American journal of pathology*, 172(1), 112–122. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070564>
- Simonaro, C. M., Haskins, M. E., & Schuchman, E. H. (2001). Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: a possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 81(9), 1319–1328. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780345>
- Stapleton, M., Arunkumar, N., Kubaski, F., Mason, R. W., Tadao, O., & Tomatsu, S. (2018). Clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Molecular genetics and metabolism*, 125(1-2), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.01.003>
- Suarez-Guerrero, J. L., Gómez Higuera, P. J., Arias Flórez, J. S., & Contreras-García, G. A. (2016). Mucopolisacaridosis: características clínicas, diagnóstico

y de manejo [Mucopolysaccharidosis: clinical features, diagnosis and management]. *Revista chilena de pediatría*, 87(4), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.10.004>

- Tessitore, A., Pirozzi, M., & Auricchio, A. (2009). Abnormal autophagy, ubiquitination, inflammation and apoptosis are dependent upon lysosomal storage and are useful biomarkers of mucopolysaccharidosis VI. *PathoGenetics*, 2(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1755-8417-2-4>
- Trowbridge, J. M., Rudisill, J. A., Ron, D., & Gallo, R. L. (2002). Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). *The Journal of biological chemistry*, 277(45), 42815–42820. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204959200>
- Trusolino, L., Bertotti, A., & Comoglio, P. M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(12), 834–848. <https://doi.org/10.1038/nrm3012>
- Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature reviews. Cancer*, 10(2), 116–129. <https://doi.org/10.1038/nrc2780>
- Yoon, S., & Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 24(1), 21–44. <https://doi.org/10.1080/02699050500284218>
- Zaballos, M. A., Acuña-Ruiz, A., Morante, M., Crespo, P., & Santisteban, P. (2019). Regulators of the RAS-ERK pathway as therapeutic targets in thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*, 26(6), R319–R344. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0098>