

————— *Artículo original* —————

## **Una aproximación farmacológica al tratamiento de la acondroplasia**

Recibido el 27 de marzo de 2008

ANA I. GUZMÁN-ARÁNGUEZ, MARTA IRAZU, TERESA PELÁEZ,  
ALMUDENA CROOKE, JESÚS SÁNCHEZ-NOGUEIRO y  
JESÚS PINTOR\*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV,  
Universidad Complutense de Madrid*

### **RESUMEN**

La acondroplasia es una patología caracterizada por una mutación en el receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos de tipo 3 (FGFR3). Esta alteración causa la patología que conocemos habitualmente con el nombre de enanismo congénito y que se manifiesta con individuos de talla baja con diversos problemas músculo-esqueléticos. La aplicación de nucleótidos y dinucleótidos ha permitido observar que las células acondroplásicas pueden fenomenológicamente comportarse como células normales, en especial cuando son tratadas con el dinucleótido  $Ap_4A$ . Este compuesto reestablece los niveles de calcio en los condrocitos acondroplásicos, permitiendo que se comporten como células absolutamente normales en lo que respecta a este ion. Por otro lado, también este dinucleótido permite que el receptor de FGFR3, que no se internaliza y degrada con normalidad, pueda pasar a ser degradado por las vías proteosomales y lisosomales, como sucede en las células normales, haciendo que el receptor motivo de la patología desaparezca de

---

**\* Dirección de contacto:**

Doctor Jesús Pintor.

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV. E. U. Óptica. Universidad Complutense de Madrid. C/ Arcos de Jalón, s/n. 28037 Madrid. Telf.: +34-91-3946859. Fax: +34-91-3946885.

e-mail: [jpintor@vet.ucm.es](mailto:jpintor@vet.ucm.es)

Página web Fundación Magar Acondroplasia: [www.acondroplasia.com](http://www.acondroplasia.com)

las membranas de los condrocitos acondroplásicos. Por último, hemos podido comprobar cómo el derivado del piridoxalfosfato, el PPADS, presenta propiedades extraordinarias al reducir prácticamente a cero los niveles de fosforilación de las proteínas ERK, que son anormalmente elevadas por el receptor FGFR3 acondroplásico y que originan la patología. En resumen, se plantean una serie de nuevas estrategias encaminadas al tratamiento de la acondroplasia por medio de estrategias de tipo farmacológico en claro contraste con las estrategias actuales de tipo quirúrgico.

**Palabras clave:** Acondroplasia.— $\text{Ap}_4\text{A}$ .—Diadenosina polifosfatos.—Enanismo congénito.—Nucleótidos.—Receptores purinérgicos.

## SUMMARY

### A pharmacological approach to achondroplasia treatment

Achondroplasia is a pathology due to a mutation in the receptor for the fibroblast growth factor type 3 (FGFR3). This alteration produces problems in individuals' stature as well as other muscle-skeletal problems. The application of nucleotides and dinucleotides permit achondroplastic cells (chondrocytes) to recover, apparently, from this pathology. In particular, the application of the dinucleotide  $\text{Ap}_4\text{A}$ , permits to restore the correct calcium levels in achondroplastic cell. Moreover, this dinucleotide permits the right degradation of the FGFR3 receptor, which does not downregulate properly in achondroplastic chondrocytes, by facilitating the proteosomal and lysosomal pathways alter the dinucleotide application. Also we have discovered that the pyridoxal phosphate derivative PPADS can dramatically reduce the activation of ERK cascade which is abnormally elevated by the achondroplastic FGFR3 receptor raising the pathology. In summary, we wish to introduce a series of new pharmacological strategies for the treatment of achondroplasia in clear contrast with the current surgery ones.

**Keywords:** Achondroplasia.— $\text{Ap}_4\text{A}$ .—Congenital dwarfism.—Nucleotides.—Purinergic receptors.

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento de los huesos largos depende de la proliferación y maduración de las células que constituyen el cartílago, los condrocitos. Estas células van a ser reemplazadas de modo gradual por el tejido óseo durante el crecimiento del individuo. Los condrocitos, en su proceso de maduración, pasan por una primera etapa en la que

se hipertrofian para posteriormente morir en un proceso de tipo apoptótico (1, 2).

El crecimiento y desarrollo de los condrocitos en los cartílagos que flanquean los huesos está controlado por los factores de crecimiento de fibroblastos. Estos factores activan cuatro tipos diferentes de receptores denominados FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4, estando los tres primeros implicados en enfermedades congénitas esqueléticas y craneales. Dentro de estas alteraciones destaca **la acondroplasia**, la forma más común de **enanismo congénito** (Figura 1). Esta patología se caracteriza por una talla baja desproporcionada y otras anomalías del esqueleto entre las que se incluyen el acortamiento rizomélico de los huesos largos, macrocefalia, abombamiento frontal y parietal, hipoplasia de la facies media, lordosis lumbar, mano en tridente y disminución caudal de la distancia interpedicular en la región lumbar (3).

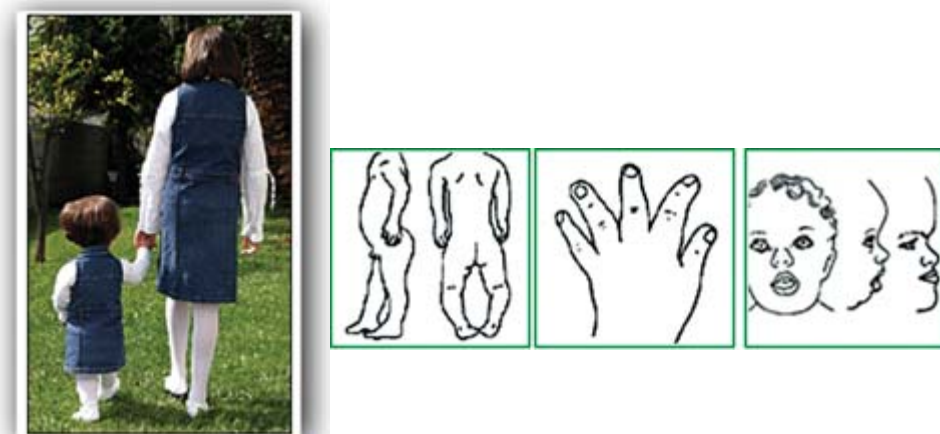


FIGURA 1. *El enanismo congénito o acondroplasia y las características óseas que lo identifican.*

El receptor alterado en la acondroplasia es el FGFR3, cuyo gen se localiza en el extremo distal del brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Estudios realizados en distintas poblaciones han establecido la existencia de una mutación frecuente (Gly380Arg) en el dominio transmembrana del receptor (4, 5).

Junto con esta modificación, observada en el 97% de los casos (Figura 2), también se han identificado otras mutaciones menos frecuentes como el cambio de una Gly 375 por Cys fuera de la región transmembrana (6, 7), la sustitución de la Gly 346 por Glu (8), así como el reemplazamiento de la Lys 650 por Met en el caso de la forma más severa de acondroplasia (9).

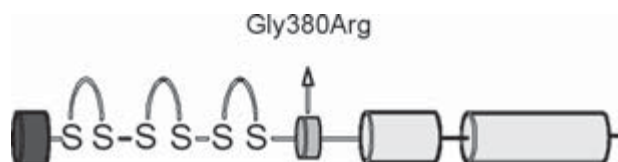


FIGURA 2. *Monómero del receptor FGFR3.*

Ratones knock-out para el gen del receptor FGFR3 presentan un aumento del crecimiento endocondrial, expansión de la placa de crecimiento ósea y aumento de la proliferación de condrocitos, lo que ha permitido sugerir el papel del receptor FGFR3 como regulador negativo del crecimiento del hueso (10), si bien las rutas a través de las cuales influye en los procesos de proliferación y diferenciación de los condrocitos no han sido totalmente esclarecidas.

Como miembro de la familia de receptores con actividad tirosina quinasa, este receptor se activa en presencia del FGF y de proteoglicanos del grupo heparán sulfato, para producir la dimerización del receptor y la posterior autofosforilación de los residuos de tirosina. Estos residuos fosforilados de tirosina sirven como sitios de unión de proteínas y efectores que propagan las señales de FGFR3 (11, 12). Los desórdenes en el crecimiento del hueso son resultado del aumento de la transmisión de señales por parte del receptor mutado como consecuencia de la activación sostenida del mismo. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar cómo se produce esta activación continuada de FGFR3. Por ejemplo, en el caso de la mutación G380R, la más típica de la acondroplasia y que afecta a la región transmembrana, se origina una estabilización del dímero, prerequisite para la activación del receptor y que le conduce a activarse incluso en ausencia del agonista (13, 14). Las mutaciones que provocan la introducción de residuos de cisteína libres en el dominio

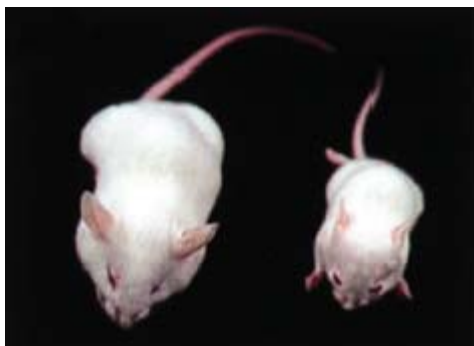
extracelular del receptor originan la formación de puentes disulfuro, lo que igualmente ocasiona la presencia continua de la forma dimérica del receptor (15). Otras mutaciones como la K650M se piensa que alteran la conformación del receptor y llevan a la activación constitutiva de la actividad tirosina quinasa (12, 16). Adicionalmente se ha sugerido que el receptor FGFR3 mutado presenta una menor degradación lisosomal permitiendo su desvío a la ruta de reciclaje y prolongando de esta forma su supervivencia y consiguientemente su capacidad continua de enviar señales (17).

Independientemente de cómo se origine la activación sostenida del receptor, una vez que ésta se produce se altera el equilibrio normal entre los procesos de proliferación y maduración inhibiéndose el correcto crecimiento de la placa ósea.

Gran parte de los estudios que se han realizado hasta el momento están dirigidos a determinar las vías de señalización celular empleadas por el receptor FGFR3 activado para mediar sus efectos sobre la proliferación y diferenciación de condrocitos. Así, distintas investigaciones han identificado a la ruta de señalización de STAT1 como la vía a través de la cual el receptor FGFR3 inhibe la proliferación de los condrocitos (18). La activación de STAT1 provoca el aumento de expresión del inhibidor de ciclo celular p21, bloqueándose de esta forma el crecimiento celular.

Con respecto a la influencia del receptor FGFR3 en la diferenciación de condrocitos existe aún una cierta controversia. Mientras algunos autores sostienen que la activación de FGFR3 acelera el proceso de diferenciación promoviendo el incremento de condrocitos hipertróficos (19, 20), otros plantean que la activación del receptor inhibe la diferenciación de condrocitos a través de la ruta de señalización celular de las MAP kinasas (21). Además, también mediante esta cascada de señalización celular de las MAP kinasas, la activación constitutiva de FGFR3 provoca una menor síntesis de matriz extracelular, hecho que también influiría en la inhibición del crecimiento óseo (22).

Para abordar todos estos estudios están siendo empleados diversos sistemas modelo. Así, se ha diseñado un ratón modificado genéticamente al que se le ha incorporado el gen mutado del receptor FGFR3 (23, 24) (Figura 3).

FIGURA 3. *Ratón normal y acondroplásico.*

Este ratón presenta alteraciones características de la acondroplasia como pequeño tamaño, área cráneo facial reducida, hipoplasia facial, distorsión craneal, cifosis y placas de crecimiento óseo de los huesos largos muy reducidas. Junto con este modelo animal también se utilizan cultivos primarios de condrocitos o células como las de condrosarcoma de rata (RCS), que presentan marcadores característicos de condrocitos (25). Adicionalmente se emplean condrocitos de rata (RCJ) transfectados de manera estable tanto con el receptor FGFR3 humano intacto como con la forma mutada G380R (Figura 2) (26).

Los nucleótidos y dinucleótidos son moléculas biológicamente activas capaces de modificar la actividad de numerosos tejidos (27, 28). Tanto los mononucleótidos, como el ATP, como los dinucleótidos ejercen sus acciones a través de una familia de receptores denominados receptores purinérgicos P2 (Figura 4). Aunque el ATP es por todos bien conocido, no lo son tanto los dinucleósidos polifosfatos. Estas moléculas son dinucleótidos formados por dos nucleósidos (corrientemente adenosinas o uridinas) unidos entre sí por un número variable de fosfatos (NpnN, donde n es el número de fosfatos). Los dinucleósidos polifosfatos más habituales son los formados por adenina, como base nitrogenada, conformando una familia de compuestos denominada *diadenosín polifosfato* o ApnA, donde la longitud de los fosfatos oscila entre 2 y 7 (29).

La actividad de estos dinucleótidos se lleva a cabo tanto a través de receptores de naturaleza ionotrópica, denominados P2X, como a

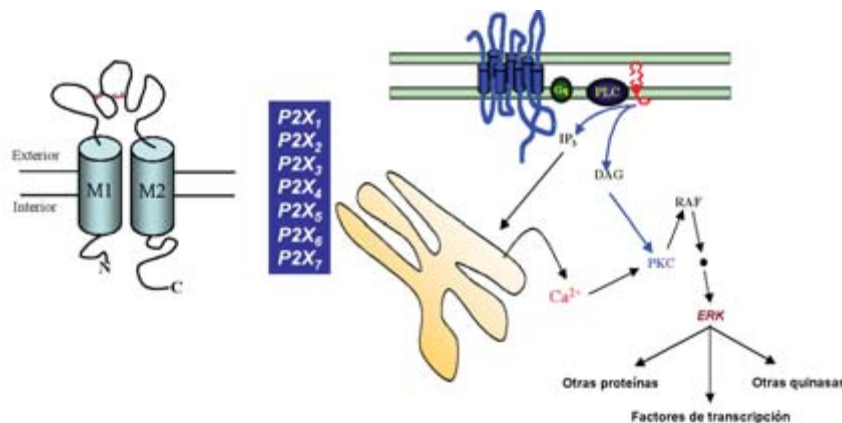


FIGURA 4. *Receptores purinérgicos P2X (izquierda) y P2Y (derecha).*

través de receptores metabotrópicos del tipo P2Y (27). Los receptores del tipo P2Y, más importantes en este estudio, tienen la estructura clásica de siete dominios transmembrana, estando acoplados a fosfolipasa C (PLC) y a la consiguiente producción de diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). Existen hasta ocho tipos diferentes de receptores P2Y, entre los cuales algunos como el P2Y<sub>12</sub> está también acoplado negativamente a la adenilato ciclasa. En otros casos como en el del P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub> se ha podido constatar su capacidad de activar la guanilato ciclasa con la consiguiente producción del GMPc (30). Otra propiedad de los receptores P2Y es estar en la mayoría de los casos acoplado igualmente a la cascada de las MAP quinasas.

Es precisamente la habilidad que presentan algunos nucleótidos de intervenir en la cascada de las MAP quinasas y de activar la guanilato ciclasa lo que puede hacer atractivas a estas moléculas para el tratamiento de la acondroplasia. Por un lado, porque todo lo que sea disminuir la actividad de las MAPK va a redundar en una diferenciación celular de los condrocitos y una calidad de la matriz extracelular adecuada para permitir un crecimiento normal de hueso. Por otra parte, la posibilidad de que los nucleótidos y dinucleótidos puedan activar receptores acoplados a la guanilato ciclasa puede ayudar en el mismo sentido, ya que las elevaciones en los niveles citoplasmáticos de GMPc se sabe disminuye el nivel de fosforilación de p24 y p44 (ERK 1/2). Por este motivo, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Determinación de la presencia de receptores purinérgicos P2Y en condrocitos acondroplásicos.
2. Verificación de la actividad de dichos receptores en términos de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ .
3. Comprobar el efecto de los nucleótidos y dinucleótidos sobre la cascada de las MAPK activada por el receptor FGFR3 acondroplásico.
4. Estudiar el efecto de los nucleótidos y dinucleótidos sobre la degradación del receptor FGFR3 acondroplásico.
5. Verificar el comportamiento de los derivados del piridoxal fosfato (PPADS y PPNDs).

## MÉTODOS

### Lás células: características y mantenimiento

Disponemos de células en cultivo primario obtenidas de ratones normales y acondroplásicos mantenidas en DMEM con 10% de SBF y 1% de Penicilina-Estreptomicina, y de una línea celular denominada RCJ, immortalizadas y transfectadas con el receptor FGFR3 (a las que llamamos FGFR3), con FGFR3 mutado (a las que llamamos ACH) y sin transfectar. Estas células son mantenidas en  $\alpha$ -MEM con 15% FBS, 1% Penicilina-Estreptomicina, 2  $\mu\text{g/mL}$  de Tetraciclina, 600  $\mu\text{g/mL}$  de Geneticina y 500  $\mu\text{g/mL}$  de Higromicina. El medio de cultivo con el que se realizan los pases de las células consta de los mismos componentes que el de mantenimiento a excepción de la higromicina, que añadiremos 24 horas después de realizar el pase.

Si incubamos estas células con un medio de cultivo sin tetraciclina, permitiremos que el receptor FGFR3 se exprese, y tras incubarlo con diferentes concentraciones de FGF9 podremos obtener qué concentración de este factor de crecimiento es la óptima para que se active el receptor FGFR3.

## **Inmunocitoquímica**

Los condrocitos se adhieren a coverslips para posteriormente ser fijados con paraformaldehído al 4% y ser tratados con la solución de bloqueo durante una hora (para evitar la unión inespecífica). Tras realizar dos lavados con PBS-BSA, se incuba con el anticuerpo primario (dilución 1:1000) del receptor purinérgico correspondiente o el del FGFR3. Se lava tres veces diez minutos para pasar a poner el anticuerpo secundario marcado con fluoresceína o rodamina durante una hora. Se lava a continuación tres veces (10 min.) de nuevo con PBS-BSA. El montaje se realiza añadiendo 5 mL de medio de montaje sobre el porta y esperando a su secado. Las muestras se visualizan en el microscopio confocal Zeiss (Axiovert 200) con un módulo confocal Pascal.

## **Estudios de la movilización del calcio citosólico**

Las medidas de calcio intracelular se realizan fijando las células a cubreobjetos con poli-L-Lys durante una hora a 37° C seguidas de una incubación con 5  $\mu$ M FURA2-AM o FLUO3-AM durante un tiempo que oscila entre 30 y 45 minutos. Después de ese tiempo las células lavadas y los cubreobjetos son montados en una cámara de perfusión para ser estimuladas por los diferentes mono y dinucleótidos. La fluorescencia fue observada por medio de un microscopio confocal Zeiss LSM Pascal o bien por uno Nikon conectado a una cámara CCD. La transformación de la fluorescencia en concentraciones intracelulares de calcio se realizó empleando la ecuación de Grynkiewicz (31).

## **Western blot**

Las células se lisan y centrifugan a 13.000xg, 10 minutos, a 4° C, 5  $\mu$ g de proteína se mezclan con tampón de electroforesis y se desnaturaliza 5 minutos a 100° C para ser corridos en un gel de poliacrilamida al 10% (v/p) y SDS durante 100 minutos. Tras la electroforesis, los geles se equilibran durante 30 minutos en tampón de transferencia y se transfieren durante dos horas a una membrana de PVDF. La

membrana se incuba durante una hora con tampón PBS, para ser incubado a continuación con el anticuerpo primario (FGFR3) a una dilución 1:1000 durante 18 horas a 4° C. Tras el lavado, se incuba con el anticuerpo secundario ligado a la peroxidasa (anti IgG HRP de ratón a dilución 1:1000), durante una hora. Tras el lavado, en condiciones idénticas a las del primer anticuerpo, el revelado de la membrana se realiza utilizando el kit comercial de ECL (Enhanced ChemiLuminescence; Amersham) basado en la emisión de luz por la oxidación de luminol (una diacilhidrazida cíclica) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizada por la peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo. La exposición de una película fotográfica (Hyperfilm-ECL; Amersham) a la membrana permite la detección de las bandas proteicas reconocidas por el anticuerpo tras el revelado de la película (líquidos de revelado de AGFA).

### **Estudio de la cascada de las MAP kinasas (isoformas ERK1 y ERK2)**

Para el estudio de la cascada de las MAP kinasas se partirá de células, bien sean condrocitos normales, acondroplásicos o células inmortalizadas y transfectadas con el receptor FGFR3 normal y mutado (acondroplásico). Se hará especial énfasis en la detección de las proteínas ERK1 y ERK2 por medio de un anticuerpo comercial frente al residuo Tyr204, presente en las dos isoformas. Las células serán sembradas en pocillos a razón de un millón de células por pocillo, para ser lavadas con pervanadato y así inhibir la actividad tirosina fosfatasa.

Las células tratadas serán lisadas y centrifugadas a 13.000xg, 10 minutos, a 4° C. 5 µg de proteína se mezclan con tampón de electroforesis y se desnaturaliza 5 minutos a 100° C, para ser corridos en un gel de poliacrilamida al 10% (v/p) y SDS durante 100 minutos. Tras la electroforesis, los geles se equilibran durante 30 minutos en tampón de transferencia y se transfieren durante dos horas a una membrana de PVDF. La membrana se incuba durante una hora con tampón TBS, para ser incubado a continuación con el anticuerpo primario (ERK1) a una dilución 1:1000 durante 18 horas a 4° C. Tras el lavado, se incuba con el anticuerpo secundario ligado a la peroxidasa (anti IgG HRP de ratón a dilución 1:1000), durante una hora.

Tras el lavado, se revelará la membrana con el Super Signal Substrate Western Blotting según fabricante.

## Estudios sobre la matriz extracelular

Para el estudio de los cambios de la matriz extracelular se empleará el método del *alcian blue*, que permite medir la producción de matriz extracelular al registrarse un aumento en la absorbancia a 605 nm como consecuencia de la producción de dicha matriz. El protocolo seguido es el descrito por la casa comercial (Sigma-Aldrich).

Los estudios detallados de los niveles de producción de los colágenos II y X se llevaron a cabo realizando los correspondientes wester blots, como se ha descrito previamente, empleando los anticuerpos comerciales de las casas Calbiochem y Santa Cruz, a diluciones 1:500 y 1:100, respectivamente.

## RESULTADOS

### Identificación de los receptores P2Y presentes en los condrocitos

Por medio de las técnicas de inmunocitoquímica ha sido posible identificar los receptores presentes en los condrocitos normales y acondroplásicos. De todos los anticuerpos ensayados las células se marcaron positivamente frente a los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub> (Figura 5). No fue posible observar marcaje frente a otros receptores P2Y ni en las células acondroplásicas ni en las normales.

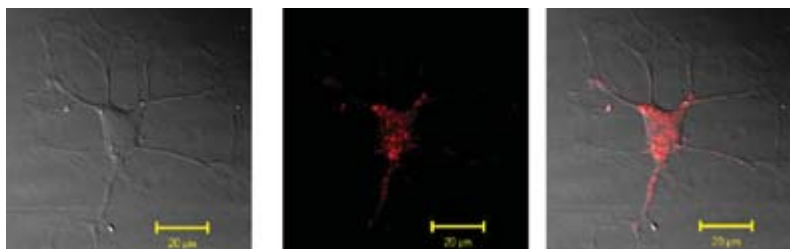


FIGURA 5. Presencia de los receptores P2Y<sub>2</sub> en los condrocitos acondroplásicos.

Un análisis realizado por la técnica de inmunotransferencia (western-blot) confirmó la presencia de los mencionados receptores en ambas poblaciones de condrocitos (resultados no mostrados).

Tanto la inmunocitoquímica como la inmunotransferencia pusieron de manifiesto la existencia de los receptores P2Y, sin embargo fue necesario dar un paso más, profundizando en la funcionalidad de los receptores, midiendo su actividad por medio de la sonda fluorescente FURA-2.

### Medidas de calcio en los condrocitos acondroplásicos

Con la idea de probar la funcionalidad de los receptores P2Y presentes en los condrocitos normales y acondroplásicos y dado que estos receptores están acoplados a la movilización del calcio citosólico de los reservorios intracelulares, estas células fueron cargadas con FURA-2AM y los niveles de calcio fueron analizados tras la estimulación con diversos mono y dinucleótidos.

La superfusión de mononucleótidos como el ATP, ADP, UTP y ADP sobre los condrocitos mostraron diferentes niveles de movilización del  $[Ca^{2+}]_i$  en las células en estudio (Figura 6).

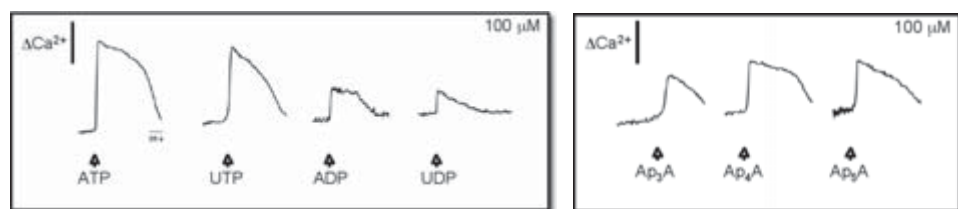


FIGURA 6. *Respuesta en los niveles de calcio intracelular de los condrocitos a los diferentes mono y dinucleótidos.*

También los diadenosina polifosfatos fueron capaces de inducir cambios en el calcio, siendo el  $Ap_4A$  y el  $Ap_5A$  los que indujeron mayores movilizaciónes del calcio en los condrocitos.

Tanto las movilizaciónes de los mononucleótidos como la de los dinucleótidos fueron independientes del calcio extracelular, confir-

mando que se trataba de receptores P2Y. Cuando el ATP, UTP y el Ap<sub>4</sub>A fueron ensayados a varias concentraciones fue posible establecer las correspondientes curvas de concentración respuesta (Figura 7).

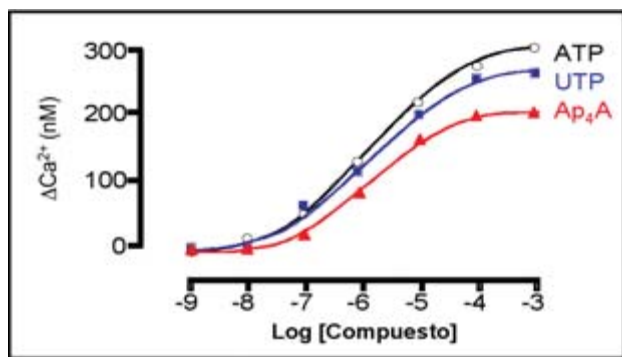


FIGURA 7. *Curvas concentración respuesta para los nucleótidos ATP, UTP y Ap<sub>4</sub>A.*

De estas curvas se pudo deducir valores de EC<sub>50</sub> que fueron 1,58  $\mu$ M para el ATP, 2,51  $\mu$ M para el UTP y 1,25  $\mu$ M para el Ap<sub>4</sub>A. El nucleótido que mostró mayores niveles de movilización fue el ATP, con un valor máximo de 312 nM, seguido por el UTP con 274 nM y el Ap<sub>4</sub>A con 197 nM.

Los estudios realizados con los antagonistas para los receptores P2 (100  $\mu$ M) mostraron diferencias cuando antagonizaban al ATP que cuando lo hacían con el Ap<sub>4</sub>A (ambos a 100  $\mu$ M). Aunque la suramina (antagonista general P2) y el MRS2179 (selectivo P2Y<sub>1</sub>) presentaron el mismo rango de antagonismo y el reactivo azul 2 (RB-2, no selectivo P2) no hizo apenas nada, el derivado del piri-doxal PPADS (no selectivo P2) funcionó de modo diferente en el caso del ATP que en el del Ap<sub>4</sub>A. El PPADS abolió el 30% de la respuesta inducida por el ATP, mientras que prácticamente abolió el 100% de la movilización de calcio inducida por el Ap<sub>4</sub>A. Este hecho sugiere que tal vez las acciones del ATP y del Ap<sub>4</sub>A, aunque semejantes en cuanto a que movilizan el calcio, podrían ocurrir a través de receptores diferentes.

## Los condrocitos acondroplásicos y la cascada de las MAP kinasas

Por medio de una línea celular de condrocitos transfectada con el receptor FGFR3 acondroplásico y el normal, regulados ambos por un sistema del tipo TET-OFF (se expresan los receptores FGFR3 en ausencia del antibiótico tetraciclina), ha sido posible estudiar la relación que existe entre los receptores P2Y y los receptores del FGF.

Los niveles de expresión del receptor FGFR3 en ausencia de la tetraciclina son grandes en comparación con los mismos en presencia del antibiótico, por lo que todos los experimentos se realizaron a continuación en ausencia de la tetraciclina.

Este control no sólo se manifestaba en los niveles del receptor, sino que también se podía valorar a nivel de la fosforilación de las proteínas ERK1/2 (p42 y p44), ya que al ser estimulado el receptor FGFR3 (normal y acondroplásico) con el sustrato FGF9, mostraban un fuerte aumento en los niveles de fosforilación de las ERK (Figura 8).

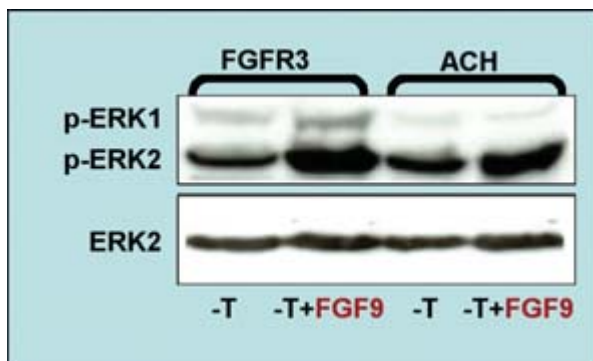


FIGURA 8. *Comportamiento de las células a la tetraciclina en relación con las proteínas ERK.*

Uno de los primeros aspectos a abordar fue probar cuál era el papel de los nucleótidos sobre la cascada de las MAP kinasas (ERK1/2), ya que antes de comprobar si la aplicación de estas sustancias pueden bajar el nivel de fosforilación de las ERK tras la estimulación del receptor FGFR3 (que sería esencial para rescatar a las células de la acondroplasia), hay que conocer qué hacen estas moléculas por sí solas.

Todos los mononucleótidos naturales estimularon la fosforilación de las ERK entre un 40 y un 50%, sin embargo, los diadenosina polifosfato apenas modificaron los valores control de fosforilación (Figura 9).

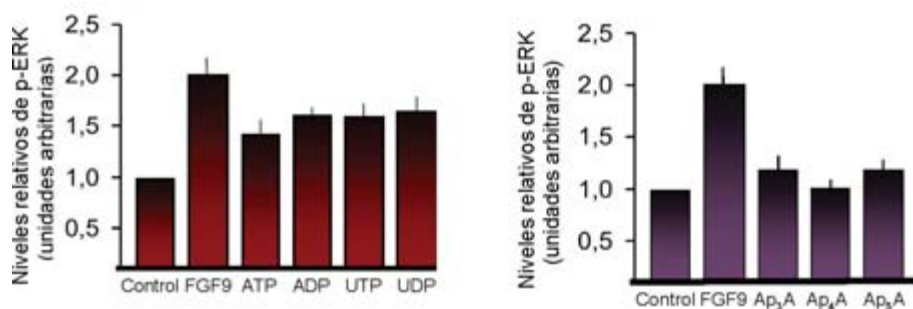


FIGURA 9. *Efecto de los mononucleótidos (izquierda) y dinucleótidos (derecha) sobre el nivel de fosforilación de las ERK.*

Cuando se ensayaron los agonistas de los receptores P2Y, 2-me-S-ADP y ATP- $\gamma$ -S, entre otros, se pudo comprobar cómo la mayoría de éstos eran capaces de aumentar el grado de fosforilación de ERK1/2.

Sin embargo, si queremos comprobar si alguno de los nucleótidos es capaz de ayudar en el tratamiento de la acondroplasia, deberíamos ensayar el nucleótido en presencia del agonista del receptor FGFR3 acondroplásico, pues de esa manera mimetizaremos el entorno real de los condrocitos acondroplásicos en la placa de crecimiento ósea.

### **Efecto de los nucleótidos y dinucleótidos en condrocitos estimulados con FGF9**

El rescate de los condrocitos de su estado acondroplásico se logrará cuando se pueda reducir el grado de fosforilación de ERK1/2 por la administración de nucleótidos o dinucleótidos. Por ello se ensayaron estas sustancias en presencia de FGF9 que de antemano incrementa la fosforilación de las ERK, tal y como sucede en la patología. La aplicación de mononucleótidos y FGF9 no hizo sino incrementar los niveles de fosforilación por encima incluso del valor producido por FGF9 (Figura 10). Cuando se repitió este protocolo con los diadenosi-

na polifosfato, fue posible observar cómo  $\text{Ap}_3\text{A}$  y  $\text{Ap}_5\text{A}$  no incrementaron la respuesta inducida por FGF9, sin embargo  $\text{Ap}_4\text{A}$  fue capaz de reducir la fosforilación inducida por FGF9 hasta los niveles del control (Figura 10).

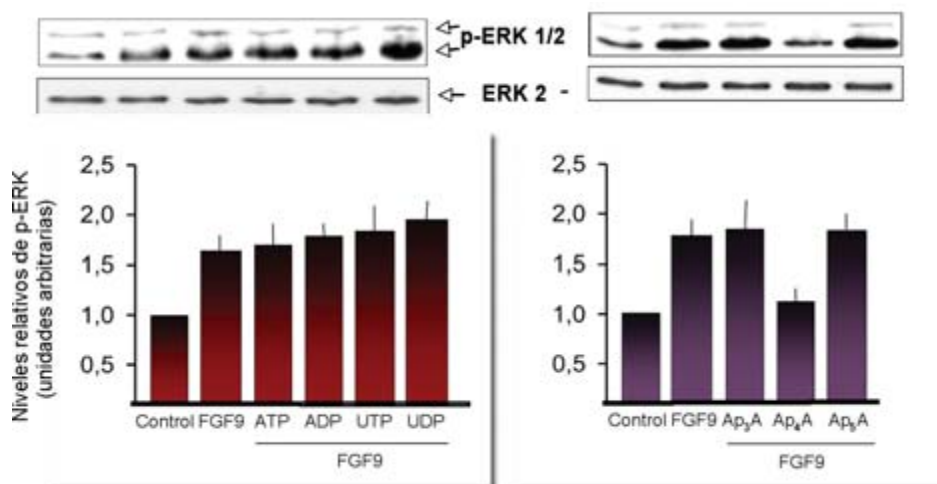


FIGURA 10. *Efecto de los mononucleótidos (izquierda) y dinucleótidos (derecha) sobre la fosforilación de ERK estimulada por FGF9.*

Cuando se ensayaron los agonistas sintéticos de los receptores P2Y, ninguno de ellos fue capaz de reducir el grado de fosforilación de las ERK, obteniéndose incluso el efecto contrario, es decir, más fosforilación.

Dado el sorprendente resultado obtenido en el caso del  $\text{Ap}_4\text{A}$ , se trató de profundizar un poco más para saber qué receptor era el responsable de la disminución de la fosforilación de las ERK. Para ello se ensayaron los antagonistas, que ya se habían valorado en el caso del calcio. La aplicación de estos compuestos a la concentración 100  $\mu\text{M}$  modificaron la respuesta del  $\text{Ap}_4\text{A}$  de manera variable (Figura 11).

Uno de los detalles más sorprendentes fue observar cómo el antagonista PPADS no sólo antagonizó el efecto del  $\text{Ap}_4\text{A}$ , sino que fue capaz de reducir los niveles de fosforilación hasta valores muy inferiores al control. Este hecho nos animó a probar el efecto del PPADS con el FGF9 a diversas concentraciones y en ausencia de cualquier nucleótido o dinucleótido.

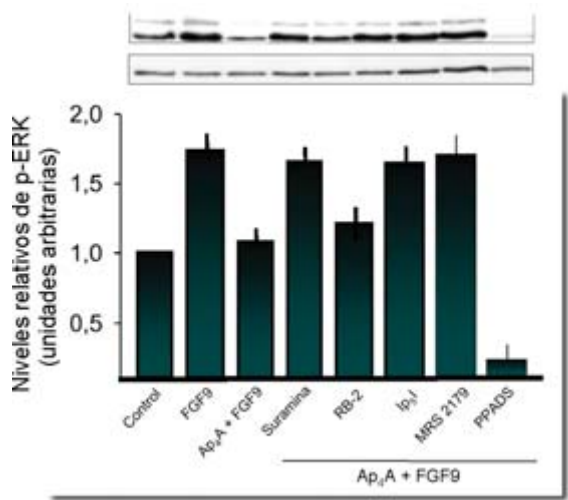


FIGURA 11. *Efecto de los antagonistas sobre el efecto del Ap<sub>4</sub>A y FGF9.*

Sorprendentemente, el antagonista PPADS, a concentraciones en el rango micromolar, fue capaz de reducir el nivel de fosforilación de ERK 1/2 inducido por el FGF9, muy por debajo de nivel del control (Figura 12). Este hecho, inesperado pero muy interesante, abre la po-

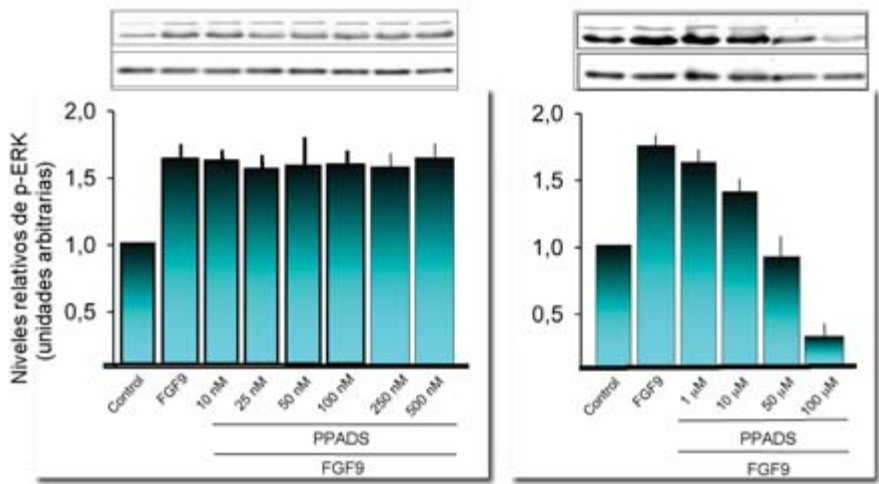


FIGURA 12. *Efecto del PPADS sobre la fosforilación de ERK1/2 estimulada por FGF9.*

sibilidad del empleo de este compuesto como agente rescatador de la condición acondroplásica, por lo menos en los condrocitos en cultivo.

### **El $\text{Ap}_4\text{A}$ reduce la proporción de receptores de FGFR3 en la membrana de los condrocitos**

Uno de los hechos que hace que el hueso no crezca en longitud como debiera es la dificultad que tiene el receptor FGFR3 de ser «downregulado». Ciertamente, la acondroplasia se convierte en enfermedad severa porque aunque el FGF se una al receptor FGFR3, en el caso de ser acondroplásico no se internaliza como lo hace el receptor normal.

Debido a la existencia de anticuerpos frente a los receptores FGFR3 es posible visualizar la densidad de receptores presentes en las células normales y acondroplásicas, tanto por inmunocitoquímica como por inmunotransferencia (western-blot).

Estudiamos cuál era el comportamiento de los receptores cuando las células eran tratadas por el FGF9 y comprobamos, tal y como indicaban otros autores, que tras la aplicación de este agonista era posible observar la desaparición del receptor FGFR3 normal y como el de FGFR3 acondroplásico seguía inalterablemente en la membrana.

Dado que el  $\text{Ap}_4\text{A}$  tenía un efecto diferente al resto de los nucleótidos al reducir la fosforilación de las ERK, pensamos en la posibilidad de que el  $\text{Ap}_4\text{A}$ , a través de un receptor no definido todavía, pudiese estar internalizando al receptor FGFR3 acondroplásico. Para verificar esta hipótesis estudiamos por técnicas de inmunocitoquímica si existían variaciones en el receptor FGFR3 acondroplásico cuando pre-tratábamos las células con  $\text{Ap}_4\text{A}$ .

Como se puede observar en la Figura 13, el efecto del dinucleótido sobre la proporción de receptores fue notable, produciendo una caída significativa de los receptores FGFR3 acondroplásicos. La disminución de receptores fue del 15 al 25%, dependiendo de la dosis empleada.

Este mismo efecto fue verificado por western-blot observando que del mismo modo que sucede en las imágenes anteriores la pro-

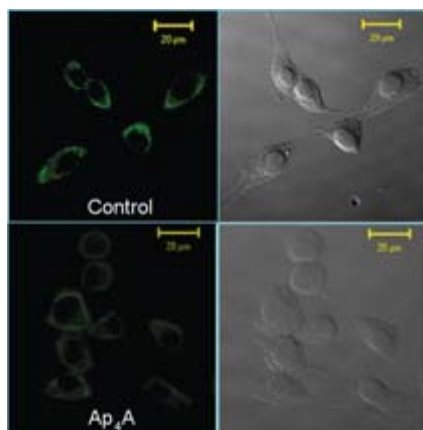


FIGURA 13. *Desaparición del receptor FGFR3 acondroplásico tras la aplicación de Ap<sub>4</sub>A.*

porción de receptores se ve disminuida tras el tratamiento con Ap<sub>4</sub>A 100 μM. La disminución fue de aproximadamente un 35% respecto a los niveles control, como se puede apreciar en la Figura 14.

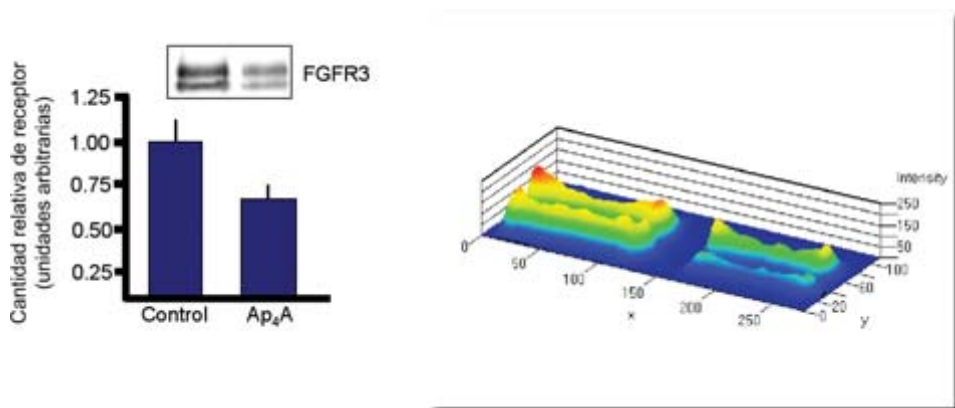


FIGURA 14. *Desaparición del receptor FGFR3 acondroplásico tras la aplicación de Ap<sub>4</sub>A analizado por western-blot.*

Este hecho sugiere que el Ap<sub>4</sub>A está modificando la proporción de los receptores de FGFR3 acondroplásicos pudiendo ser este el motivo por el que la fosforilación de las ERK disminuya.

## ¿Cómo puede el $\text{Ap}_4\text{A}$ disminuir la presencia del receptor FGFR3 acondroplásico?

Solamente de modo reciente hemos comenzado a trabajar en este aspecto, que en la actualidad nos parece uno de los más interesantes. Es sabido que debido a la mutación, el receptor FGFR3 acondroplásico no tiene una internalización como la del receptor normal. Parece ser que cuando se forma el endosoma, como fase previa a la degradación del receptor, en lugar de comenzar el ciclo degradativo el receptor vuelve de nuevo a la membrana plasmática.

Nuestra primera idea ha sido comprobar si como consecuencia de la presencia de los dinucleótidos, la degradación del receptor FGFR3 acondroplásico se acelera. Con esta idea, lo que hicimos fue tomar al  $\text{Ap}_4\text{A}$  y ensayarlo en presencia ausencia de inhibidores de la degradación lisosomal y proteosomal (MG-132 y cloroquina).

Los resultados presentados en la Figura 15 parecen sugerir que lo que hace el  $\text{Ap}_4\text{A}$  es facilitar la degradación de los receptores FGFR3 acondroplásicos porque favorece la degradación de los mismos con una eficacia mayor, o bien porque sean capaces de impedir que el endosoma vuelva a reintegrar al receptor en la membrana. Es indudablemente necesario conocer más en profundidad cómo se activan

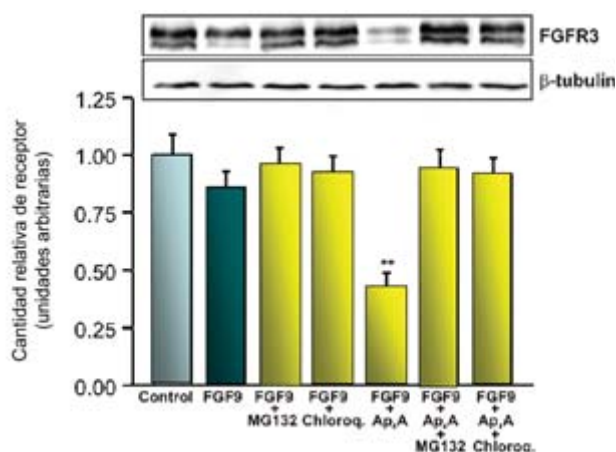


FIGURA 15. *Efecto de los inhibidores de la degradación proteosomal y lisosomal sobre el efecto del  $\text{Ap}_4\text{A}$ .*

los dos mecanismos (lisosomal y proteosomal), así como qué receptor y qué mecanismo podría permitir la interacción entre los dinucleótidos y el receptor FGFR3 acondroplásico.

### La sorpresa con los análogos del piridoxal fosfato

Como se ha podido comprobar en la Figura 12, algunos análogos del piridoxal fosfato son capaces de reducir drásticamente los niveles de fosforilación de las proteínas ERK1/2. Pensamos que si bien PPADS y PPNDS eran capaces de producir este efecto, tal vez el piridoxal y el fosfato de piridoxal podrían hacerlo igualmente. Por ello, todas estas sustancias fueron ensayadas y como se puede apreciar por la Figura 16, lamentablemente fueron incapaces de modificar la fosforilación de las ERK.

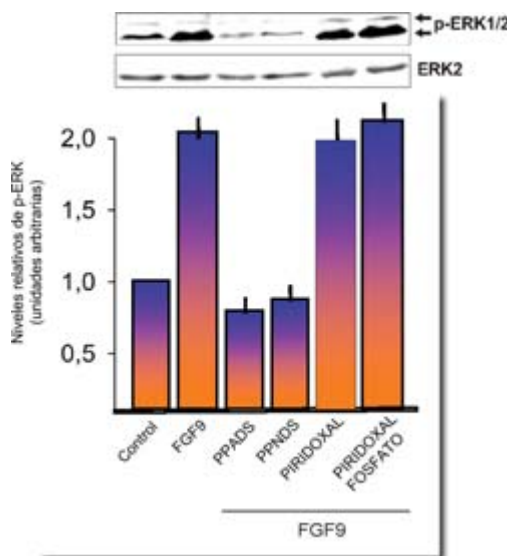


FIGURA 16. *Efecto del piridoxal y análogos sobre la fosforilación de las ERK1/2.*

La falta de efecto por parte del piridoxal fosfato sugiere que sea fundamentalmente la estructura de la molécula asociada al grupo piridoxal fosfato y no el grupo piridoxal fosfato la que introduce el efecto inhibitorio sobre las proteínas ERK 1/2.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se describe el esperanzador papel que los dinucleósidos polifosfatos pueden desempeñar para el tratamiento farmacológico de la acondroplasia. Desde el punto de vista de la patología, esta enfermedad es de las denominadas huérfanas, al no disponer en la actualidad de tratamiento de ningún tipo. La única aproximación al tratamiento es la elongación quirúrgica de las extremidades, proceso este muy tedioso, doloroso y traumático, tanto física como psíquicamente.

Dada la baja incidencia de la acondroplasia, uno cada 25.000 nacimientos, las empresas farmacéuticas no tienen interés en la investigación de esta patología porque no es económicamente rentable. Este hecho hace que solamente existan tres laboratorios en el mundo investigando sobre el tratamiento de la acondroplasia.

El Instituto Weissman de Israel, a través de una SPIN-OFF, creó los laboratorios PROCHON BIOTECH, que están estudiando la posibilidad del uso de un fragmento de un anticuerpo para bloquear al receptor FGFR3 acondroplásico como posible terapia para esta patología. Por otro lado, un laboratorio en Japón investiga con éxito el empleo de péptidos natriuréticos, que al activar la producción de GMPc consiguen disminuir la fosforilación de las MAP kinasas y así rescatar a las células acondroplásicas de la patología. Otras aproximaciones, más complejas en sus mecanismos de acción, ponen de manifiesto que los péptidos derivados de la hormona paratiroidea podrían ser buenos candidatos para el tratamiento de la acondroplasia.

Nosotros, con toda la modestia, nos gustaría contribuir a estas pocas iniciativas sugiriendo que el empleo de los dinucleósidos polifosfatos y en particular de  $Ap_4A$ , puede ser también una buena estrategia para el tratamiento, bien solo o en combinación con alguna de las otras terapias, como la producida por el PPADS y PPNS aquí descrita.

Desde un punto de vista práctico, la molécula diadenosina tetrafosfato,  $Ap_4A$  es eficaz disminuyendo los niveles de fosforilación de las ERK1/2, de manera semejante a cómo lo hacen los péptidos natriuréticos.

Uno de los aspectos más interesantes es reflexionar de qué modo el PPADS o el PPNDS pueden realizar su acción. Visto que la parte de piridoxal fosfato de la molécula es necesaria, pero insuficiente para llevar a cabo la acción inhibidora sobre las proteínas ERK, es necesario buscar otras posibilidades que justifiquen el efecto de estas dos moléculas. Recientemente se ha descubierto que las moléculas con la estructura naftalén trisulfonato se unen eficazmente al FGF, impidiendo la unión del heparán sulfato, elemento esencial para la unión del FGF a su receptor (32, 33). Si nos fijamos en la estructura de los compuestos PPADS y PPNDS, ambos con tres grupos sulfónicos y el segundo con la estructura naftaleno, sugiere que podrían tener un papel semejante al que presentan los naftalén trisulfonados. Es necesario realizar más experimentos para poder tener la certeza de que el mecanismo sugerido en esta discusión para el PPADS y PPNDS es el correcto.

Es todavía muy pronto para saber si alguna de las novedosas aproximaciones presentadas en este documento van a tener la posibilidad de ser ensayadas en un futuro en los seres humanos. Sin embargo, una reflexión detallada de la naturaleza de estas sustancias ponen de manifiesto su origen natural. Este hecho facilitaría extraordinariamente el avance de los correspondientes ensayos clínicos, ya que de algunas de ellas, como los dinucleótidos o los derivados del piridoxal, ya se han hecho las pruebas de tolerancia y toxicidad, lo que permitiría iniciar los ensayos clínicos en un breve período de tiempo.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestra gratitud a los laboratorios PROCHON BIOTECH por la cesión de los precursores de condrocitos RCJ-FGF receptor tipo 3<sup>G380R</sup>. Este trabajo ha sido financiado gracias a becas de investigación de la Fundación Magar, Fundación López Hidalgo, Asociación Pegral, Asociación Crecer y Santander-Complutense PR41/06-14962.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) ROACH, H. I.; ERENPREISA, J. and AIGNER, T. (1995): Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J. Cell Biol.* 131: 483-494.
- (2) GIBSON, G.; LIN, D. L. and ROQUE, M. (1997): Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture. *Exp. Cell Res.* 233: 372-382.
- (3) ANON, J. (1988): Human achondroplasia. A multidisciplinary approach. Proceeding of the first international symposium. November 19-21, Rome, Italy. *Basic Life Sci.* 48: 1-419.
- (4) SHIANG, R.; THOMPSON, L. M.; ZHU, Y. Z.; CHURCH, D. M.; FIELDER, T. J.; BOCIAN, M.; WINOKUR, S. T. and WASMUTH, J. J. (1994): Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell.* 78: 335-342.
- (5) ROUSSEAU, F.; BONAVENTURE, J.; LEGEAI-MALLET, L.; PELET, A.; ROZET, J. M.; MAROTEAUX, P.; LE MERRER, M. and MUNNICH, A. (1994): Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature.* 371: 252-254.
- (6) SUPERTI-FURGA, A.; EICH, G.; BUCHER, H. U.; WISSER, J.; GIEDION, A.; GITZELMANN, R. and STEINMANN, B. (1995): A glycine 375-to-cysteine substitution in the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor-3 in a newborn with achondroplasia. *Eur. J. Pediatr.* 154: 215-219.
- (7) CHEN, L.; ADAR, R.; YANG, X.; MONSONEGO, E. O.; LI, C.; HAUSCHKA, P. V.; YAYON, A. and DENG, C. X. (1996): Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* 271: 15292-15297.
- (8) PRINOS, P.; COSTA, T.; SOMMER, A.; KILPATRICK, M. W. and TSIPOURAS, P. (1995): A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Hum. Mol. Genet.* 4: 2097-2101.
- (9) IWATA, T.; CHEN, L.; LI, C.; OVCHINNIKOV, D. A.; BEHRINGER, R. R.; FRANCOMANO, C. A. and DENG, C. X. (2000): A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum. Mol. Genet.* 9: 1603-1613.
- (10) COLVIN, J. S.; BOHNE, B. A.; HARDINNG, G. W.; MCEWEN, D. G. and ORNITZ, D. M. (1996): Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* 12: 390-397.
- (11) SCHLESSINGER, J.; PLOTNIKOV, A. N.; IBRAHIMI, O. A.; ELISEENKOVA, A. V.; YEH, B. K.; YAYON, A.; LINHARDT, R. J. and MOHAMMADI, M. (2000): Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell.* 6: 743-750.
- (12) HART, K. C.; ROBERTSON, S. C. and DONOGHUE, D. J. (2001): Identification of tyrosine residues in constitutively activated fibroblast growth factor receptor 3 involved in mitogenesis, Stat activation, and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Mol. Biol. Cell.* 12: 931-942.
- (13) NASKI, M. C.; WANG, Q.; XU, J. and ORNITZ, D. M. (1996): Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat. Genet.* 13: 233-237.

- (14) WEBSTER, M. K. and DONOGHUE, D. J. (1996): Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J.* 15: 520-527.
- (15) SOROKIN, A.; LEMMON, M. A.; ULLRICH, A. and SCHLESSINGER, J. (1994): Stabilization of an active dimeric form of the epidermal growth factor receptor by introduction of an inter-receptor disulfide bond. *J. Biol. Chem.* 269: 9752-9759.
- (16) LIEVENS, P. M.; MUTINELLI, C.; BAYNES, D. and LIBOI, E. (2004): The kinase activity of fibroblast growth factor receptor 3 with activation loop mutations affects receptor trafficking and signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 43254-43260.
- (17) CHO, J. Y.; GUO, C.; TORELLO, M.; LUNSTRUM, G. P.; IWATA, T.; DENG, C. and HORTON, W. A. (2004): Defective lysosomal targeting of activated fibroblast growth factor receptor 3 in achondroplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 609-614.
- (18) SAHNI, M.; AMBROSETTI, D. C.; MANSUKHANI, A.; GERTNER, R.; LEVY, D. and BASILICO, C. (1999): FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev.* 13: 1361-1366.
- (19) MININA, E.; KRESCHER, C.; NASKI, M. C.; ORNITZ, D. M. and VORTKAMP, A. (2002): Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev. Cell.* 3: 439-449.
- (20) DAILEY, L.; LAPLANTINE, E.; PRIORE, R. and BASILICO, C. (2003): A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. *J. Cell. Biol.* 161: 1053-1066.
- (21) MURAKAMI, S.; BALMES, G.; MCKINNEY, S.; ZHANG, Z.; GIVOL, D. and DE CROMBRUGGHE, B. (2004): Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.* 18: 290-305.
- (22) YASODA, A.; KOMATSU, Y.; CHUSHO, H.; MIYAZAWA, T.; OZASA, A.; MIURA, M.; KURIHARA, T.; ROGI, T.; TANAKA, S.; SUDA, M.; TAMURA, N.; OGAWA, Y. and NAKAO, K. (2004): Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat. Med.* 10: 80-86.
- (23) WANG, Y.; SPATZ, M. K.; KANNAN, K.; HAYK, H.; AVIVI, A.; GORIVODSKY, M.; PINES, M.; YAYON, A.; LONAI, P. and GIVOL, D. (1999): A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 4455-4460.
- (24) SEGEV, O.; CHUMAKOV, I.; NEVO, Z.; GIVOL, D.; MADAR-SHAPIRO, L.; SHEININ, Y.; WEINREB, M. and YAYON, A. (2000): Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3(G380R) transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 9: 249-258.
- (25) ROZENBLATT-ROSEN, O.; MOSONEGO-ORNAN, E.; SADOT, E.; MADAR-SHAPIRO, L.; SHEININ, Y.; GINSBERG, D. and YAYON, A. (2002): Induction of chondrocyte growth arrest by FGF: transcriptional and cytoskeletal alterations. *J. Cell. Sci.* 115: 553-562.
- (26) MONSONEGO-ORNAN, E.; ADAR, R.; FEFERMAN, T.; SEGEV, O. and YAYON, A. (2000): The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3

- uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. *Mol. Cell. Biol.* 20: 516-522.
- (27) BURNSTOCK, G. and KNIGHT, G. E. (2004): Cellular distribution and functions of P2 receptors subtypes in different systems. *Int. Rev. Cyt.* 240: 31-304.
  - (28) MIRAS-PORTUGAL, M. T.; GUALIX, J.; MATEO, J.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTE, R.; CASTRO, E. and PINTOR, J. (1999): Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Prog. Brain Res.* 120: 397-409.
  - (29) PINTOR, J.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GUALIX, J.; GÓMEZ-VILLAFUERTE, R.; HERNADO, F. and MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2000): Diadenosine polyphosphates receptors: from rat and guinea pig brain to heuman centyral nervous system. *Pharmacol. Ther.* 87: 103-115.
  - (30) BUVINIC, S.; BRIONES, R. and HUIDIOBRO-TORO, J. P. (2002): P2Y1 and P2Y2 receptors are coupled to the NOS/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bead. *Brit. J. Pharmacol.* 135: 847-856.
  - (31) GRYNKIEWICZ, G.; PONIE, M. and TSIE, R. Y. A. (1985): New generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.
  - (32) CUEVAS, P.; REIMERS, D.; DÍAZ, D.; LOZANO, R. M. and GIMÉNEZ GALLEG, G. (1999): Apoptosis of glioma cells induced by the fibroblast growth factor inhibitor 1, 3, 6 naphthalene trisulphonate. *Neurosci. Lett.* 275: 149-151.
  - (33) LOZANO, R. M.; JIMÉNEZ, M. A.; SANTORO, J.; RICO, M. and GIMÉNEZ GALLEG, G. (1998): Solution structure of acidic fibroblast growth factor bound to 1,3,6 naphthalentrisulfonate: a minimal model for the antitumoral action of suramins and suradistas. *J. Mol. Biol.* 281: 899-915.