



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE VETERINARIA**

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL Y TERAPIA GÉNICA

**DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE
LA MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA
(MORQUIO A)**

VÍCTOR SÁNCHEZ CLARES

ALBERT RIBERA SÁNCHEZ

FÀTIMA BOSCH TUBERT

La presente tesis doctoral se ha llevado a cabo bajo la dirección de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert y el Dr. Albert Ribera Sánchez en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la facultad de Veerinària y en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG).

VÍCTOR SÁNCHEZ CLARES

ALBERT RIBERA SÁNCHEZ

FÀTIMA BOSCH TUBERT

SEPTIEMBRE 2018

BELLATERRA

*A Ti,
por ser la vela que siempre iluminará mi camino*

Y hasta aquí hemos llegado. Como para todo aquel que se planteó en su día hacer una tesis doctoral, para mi no ha sido distinto. El camino ha sido mucho más difícil de lo que parecía a simple vista y mucho más largo, pero también ha sido mucho más enriquecedor de lo que jamás nadie podría haberme advertido. Durante este largo camino he coincidido con muchísimas personas a las que intentaré expresar mi enorme gratitud en unas pocas líneas.

En primer lugar, querría agradecer a la **Dra. Fàtima Bosch** la oportunidad de poder realizar la tesis doctoral en su grupo, en el que he podido gozar de un ambiente y unas condiciones envidiables. Gracias por la dedicación, entusiasmo y energía que pones en cada uno de los proyectos en los que te embarcas.

Muchísimas gracias a mi co-director. **Albert**, en su día me agradeciste que me convirtiera en tus manos para acabar los últimos detalles de tu tesis. Yo hoy te agradezco que en este tiempo te hayas convertido en ese hermano mayor que nunca he tenido. Gracias por escuchar todas mis dudas, para las que normalmente no hay respuesta, gracias por preocuparte y muchísimas gracias por la ayuda en todo.

Muchísimas gracias a todo el *LSD Team*. A mis **Zuleros**, gracias por ser la alegría de la huerta, gracias por tantas y tantas tardes de SAF y sobre todo de SAAAAF en las que habéis hecho que inundase mis penas en tinto de verano y bravas, pero sobre todo GRACIAS por estar siempre ahí, sois el mejor resultado de esta tesis. ¡Siempre VIXAJO! **Sara**, nunca me había sentido tan a gusto al lado de alguien que haya amenazado con matarme tantas veces como tú. A ti agradecerte toda la ayuda y sinceridad que me has brindado en todo este tiempo. **Sandra**, miss moño a la fuga, muchas gracias por los ánimos en aquellos momentos de tirarlo todo por la borda y gracias por las infinitas horas de ojos en las que trabajar:chafardear eran 50:50. **Carles**, gracias por no tener nunca un NO y estar siempre dispuesto a ayudar sin importar la recompensa a cambio. **Jennifer**, gracias por toda la ayuda prestada en este tiempo, gracias por las visitas al Zulo en las que contagias alegría y sobre todo gracias por haber puesto el listón de los amigos invisibles a una altura de campeonato. **Vicky**, hiciste que la ciencia me pareciera interesante así que en parte debería culparte de que haya acabado aquí, pero en vez de eso te doy un enorme GRACIAS y te digo “Hasta siempre”. **Gemma**, nuestra última incorporación, muchas gracias por los papeles de última hora. A ti darte todos los ánimos y fuerzas para afrontar el camino que te espera y por último **Marisa**, el nuevo *comodín* del equipo, gracias por tu paciencia y dedicación en todo lo que haces. En definitiva, *LSD team* escribiría páginas y páginas enteras agradeciendo todo lo que habéis hecho por mí, pero a este ritmo tendré más páginas de agradecimiento que de resultados.

Al *Adipose Team*, muchas gracias por todos los momentos que me habéis regalado. **Claudia**, gracias por tu alegría y por echar siempre una mano cuando se te necesita, aunque sea al cuello. **Nia**, gracias por esos abrazos que resetean el alma. **Sarita**, gracias por convertir el laboratorio en una galería de arte. **Jordi**, mi delegado favorito, gracias por solucionar cualquier problema informático que se haya cruzado en mi camino. **Víctor**, mi choni empollón, gracias por empezar el camino conmigo y no separarte nunca, gracias por saber escucharme y por convertirte en un gran amigo. **Ignasi**, no me hiciste caso en su día... y aquí te ves. No puedo asegurarte lo fácil o difícil que será la tesis, pero te garantizo que será en la mejor de las compañías. **Vero**, gracias por involucrarte cuando nadie te lo ha exigido y **Sergio**, gracias por esas largas explicaciones sobre los ELISAs en las que no quedó opción a dudas.

Al despacho de la 3ª. **Xavi León**, muchas gracias por producir con suma pulcritud los vectores necesarios para la realización de esta tesis, sin olvidarme nunca del hecho de que lo hagas acompañado de ese enorme sentido del humor y a ti, **María**, gracias por tus historietas de “antaño” y por estar siempre dispuesta a ayudar.

Al despacho de la 4ª. **Miquel**, gracias por iniciar el camino de las MPSs, gracias por tantos y tantos *primers*, por enseñarnos la sutileza del humor inteligente y por transmitir calma cuando ha sido necesario. **Ivet**, gracias por tus conocimientos y tu disposición a compartirlos en los ratos de “obtención de muestras”. **Laia**, gracias por ser la mejor de las secretarías y por esa bondad y felicidad contagiabile y **Alba**, gracias por TODO, por enseñarme que sin una buena base no hay cimientos que construir y por convertirte en lo más parecido a una madre (de las jóvenes y guapas) que podría haber tenido fuera de casa.

Al grupo del Dr. Ruberte. En primer lugar, gracias al **Dr. Ruberte** por encontrar siempre un momento para ayudarme en el desarrollo de esta tesis y por hacerlo con el entusiasmo que le caracteriza. **Vero** y **Ángel**, gracias por todos los estudios de microscopía electrónica. **David**, gracias por las infinitas horas de confocal y de Slit-Lamp. **Lore**, gracias por haberte involucrado en este trabajo de una forma ejemplar, por tu preocupación y por el cuidado con el que trabajas y **Marc**, gracias por todo el análisis óseo.

Al laboratorio de la 4ª. **Sylvie** y **Tura**, gracias por vuestra amabilidad y disponibilidad para responder a cualquier pregunta. **Meritxell**, gracias por tu trabajo en la producción de virus y por hacerlo con tanto esmero. **Cristina**, gracias por las clases de ballet en las horas de café y gracias por haber hecho del laboratorio un lugar muy divertido.

A la UAT. **Anna P**, **Anna A** y **Sandra**, gracias por haber iniciado el camino de esta tesis a mi lado y por no haber dejado de sonreír durante todo el trayecto.

A la Cocina. **Jenni** y **Lidia**, muchas gracias por ese enorme trabajo en la sombra que hace que el nuestro sea mucho más sencillo y sobre todo gracias por vuestras risas, el CBATEG no podría tener un mejor hilo musical.

Laboratorio de Inmunos. **Marta**, gracias por todo tu trabajo y por haber sabido compartir tu lugar de trabajo conmigo cuando lo he necesitado.

Al soporte administrativo. **Montse** y **Rosmi**, gracias por hacer que el trabajo de papeleo parezca tan sencillo y por toda la amabilidad que me habéis brindado.

Al SER-CBATEG. A **todo el personal del SER**, muchas gracias por todo el trabajo realizado en el cuidado y mantenimiento de los animales y un especial gracias por toda la comprensión que habéis tenido conmigo estos últimos años.

Al personal del Hospital Clínic. Gracias a la **Dra. Ribas** y todo su equipo, en especial a **Judit**, por todos los análisis de LC-MS/MS y por vuestro interés en la obtención de resultados.

Un especial recuerdo a los compañeros que se fueron del CBAETG: **Luca**, **Tami**, **Pilar**, **Edu** y **Efrén**. Y a todo el personal de **mantenimiento**, **limpieza** y **seguridad** del centro, gracias por hacer del CBATEG un lugar mejor.

A mi familia. A ti **mamá** porque muchas veces pensé en lo que pondría en mis agradecimientos, pero nunca pensé que los escribiría en estos sillones, desde los que te doy las gracias por todo. Gracias por ser el ejemplo que seguir, por ser la referencia a la que imitar y por ser la meta que alcanzar. Me has enseñado que lo que no te mata te hace más fuerte y nosotros de fuerza sabemos un rato. A mi **padre**, por ser la mejor persona que he conocido y que seguro conoceré. Gracias por ayudar incluso cuando ni siquiera eres consciente de estar haciéndolo. A mi **hermana**, por ser la niña de mis ojos y por esa bondad infinita que la caracteriza. A mi **tía**, gracias por ser una segunda madre. A mis **primos**, por estar siempre ahí y por ser un apoyo en todo lo que he necesitado y a mis **pequeñajos**, por enseñarme el valor de la inocencia. A mi **abuela**, por crearme capaz de parar el mundo y a la **familia Orta**, gracias por haberme acogido y por disfrutar de mis logros como si fuese un miembro más.

A mis amigos. **Albert**, **Rubén** y **Guille**, gracias por haber sabido esperarme cuando los exámenes y trabajos se convirtieron en mi prioridad. **Mary**, gracias por ser la amiga que siempre está ahí, sin importar el problema o la aventura que afrontar. **Andrés**, el

mejor daño colateral de esta tesis, apareciste en un momento difícil para mi y te agradezco que te hayas quedado en todos los que han venido después, tanto malos como buenos.

A mis bioquímicos. **Edu, Sara, Patri, Blanca, Víctor y Ana**. Gracias por el compañerismo y la amistad que me habéis regalado des del primer día que os conocí, gracias por las infinitas horas de estudio y de no estudio que me han convertido en el investigador que soy a día de hoy.

A los “tapadera”. **Matilde y Luis**. Muchas gracias por haber hecho cómicos los momentos más difíciles de la tesis y por haber sido el saco de boxeo en el que desahogarse en los momentos difíciles. Gracias por la función que ni siquiera imagináis que habéis llevado a cabo.

Y por último al amor de mi vida. **Blanca**, gracias por haber hecho que pase de “escribir una tesis” a que “escribamos una tesis”, gracias por la infinita comprensión, gracias por cuidarme y gracias por quererme. Gracias por haber sabido transmitirme la calma que he necesitado en este último tramo. En definitiva, gracias por acompañarme en todas las locuras en las que me embarco. ¡Ahora, a por la siguiente!

Esta tesis ha sido posible, en primer lugar, gracias a una beca predoctoral FI financiada por la Generalitat de Catalunya, de la que he sido beneficiario durante tres años. La investigación se ha realizado también gracias al financiamiento recibido del Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional I+D+I (SAF2014-54866-R); del Ministerio de Economía y Competitividad (INNPACTO, IPT-2012-0772-300000); de l’Agència de Gestió d’ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya (2014 SGR 1669); de la Asociación de las Mucopolisacaridosis y Síndromes Relacionados (MPS ESPAÑA); y de los Laboratorios del Dr. Esteve S.A.

µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
3MSCT	<i>3 Minutes Stair Climb Tests</i> ; Test de Subir Escaleras en 3 Minutos
4-MU	4-Metilumbeliferona
6MWT	<i>6 Minutes Walking Test</i> ; Test de la marcha de los 6 minutos
Å	Ángstrom
aa	Aminoácido
AAV	<i>Adeno-associate virus</i> ; Virus adenoasociados
AG	Aparato de Golgi
Amp^R	Resistencia a Ampicilina
ARSA	Arilsulfatasa A
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barrera Hematoencefálica
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i> ; Proteínas Morfogénicas Oseas
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C4S	Condroitín 4-Sulfato
C6S	Condroitín 6-Sulfato
CAG	Promotor híbrido formado por el <i>enhancer</i> del CMV y por el promotor de la β-actina de pollo
CBATEG	Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica
cDNA	DNA complementario
CDS	<i>Coding Sequence</i> ; Secuencia Codificante
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> ; Ovario de Hámster Chino
cm	Centímetro
CMV	Citomegalovirus
CS	Condroitín Sulfato
CsCl	Cloruro de Cesio
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DBS	<i>Dried Blood Spot</i> ; Gota de Sangre Coagulada
DMB	<i>Dimetilenblue</i> ; Azul de dimetileno
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
dsDNA	<i>Double-Stranded DNA</i> ; DNA de cadena doble
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EEUU	Estados Unidos
EF1	Elongation Factor 1

ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ; Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ERT	<i>Enzyme Replacement Therapy</i> ; Terapia de Reemplazo Enzimático
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	gramos
G	Gauge
G/C	Guanina/Citosina
GAG	Glicosaminoglicano
GALNS	N-Acetilgalacosamina 6-sulfatasa
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> ; Proteína fibrilar ácida de la glia.
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> ; Proteína Verde Fluorescente
h	Hora
HA	Hidroxiapatita
hAAT	<i>Human α-antitripsin</i>
Het	Heterocigoto
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> ; Antigen Leucocitario Humano
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cells</i> ; Células Madre Hematopoyéticas
HSCT	<i>Hematopoietic Stem Cells Transplantation</i> ; Trasplante de Células Madre Hematopoyéticas
HSV	Herpesvirus
hUMSC	<i>Human Umbilical cord-derived Mesenchymal Stem Cell</i> ; Células madre mesenquimales humanas de cordón umbilical
IMPC	<i>International Mouse Phenotyping Consortium</i>
ITR	<i>Inverted Terminal Repeat</i> ; Repetición Terminal Invertida
IV	Intravenosa
kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
KI	<i>Knock-in</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LAMP-1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i> ; Proteína lisosomal asociada a membrana tipo 1
LAMP-2	<i>Lysosomal-associated membrane protein 2</i> ; Proteína lisosomal asociada a membrana tipo 2
LC-MS/MS	Espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida
LMP	<i>Lysosomal Membrane Proteins</i> ; Proteínas integrales de la membrana lisosomal
LSD	<i>Lysosomal Storage Disorders</i> ; Enfermedades de depósito lisosomal
m	Metro

mm	Milímetro
M	Molar
M6P	Manosa 6-Fosfato
M6PR	Receptor de Manosa 6-Fosfato
MDL	<i>Metachromatik Leukodistrophy</i> ; Leucodistrofia Metacromática
MEC	Matriz Extracelular
mESC	<i>Murine Embryonic Stem Cell</i> ; Celula madre embrionária de ratón
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
mg	Miligramo
micro-CT	Microtomografía Computarizada
min	Minuto
miRISC	<i>MicroRNA-Induced Silencing Complex</i>
miRNA	microRNA
MiRT	Secuencia diana de miRNA
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPS	Mucopolisacaridosi
mRNA	RNA mensajero
NBS	<i>New born screening</i> ; Diagnóstico neonatal
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
o/n	<i>Overnight</i>
°C	Grado Centígrado
omGalns	<i>Galns</i> murina optimizada
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>Open Reading Frame</i> ; Marco Abierto de Lectura
pb	<i>Base pair</i> ; Par de bases
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reacción en cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehido
qPCR	PCR Cuantitativa
QS	Queratán Sulfato
RB	<i>Roller Bottle</i>
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
rGALNS	GALNS recombinante
RNA	Ácido Ribonucléico

Rpm	Revolución por minuto
s	Segundo
scAAV	Self-Complementary AAV
SDET	<i>Substrate Degradation Enzyme Therapy</i> ; Terapia de Degradación de Sustrato
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> ; Error estándar de la media
SER	Servicio de Estabulación de Ratones
SNC	Sistema Nervioso Central
SRT	<i>Substrat Reduction Therapy</i> ; Terapia de Reducción de Sustrato
ssDNA	<i>Single-Stranded DNA</i> ; DNA de cadena senzilla
ssRNA	<i>Single-Stranded RNA</i> ; RNA de cadena senzilla
SUMF1	<i>Sulfatase Modifying Factor 1</i>
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
UA	Unidades Arbitrarias
UAB	Universidad Autónoma de Barcelona
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> ; Cromatografía líquida de ultra resolución
UTR	<i>Untranslated Region</i> ; Regiones no traducidas
V	Voltio
vg	Viral Genome
w/v	<i>Wheight/Volume</i> ; Peso/Volumen
WT	<i>Wild-type</i>

I. PRESENTACIÓN	1
II. INTRODUCCIÓN	4
1. ENFERMEDADES RARAS	5
1.1. Medicamentos huérfanos	5
2. LISOSOMAS Y ENFERMEDADES POR DEPÓSITO LISOSOMAL	6
2.1. Lisosomas y enzimas lisosomales.....	6
2.2. Enfermedades por depósito lisosomal.....	9
2.2.1. Clasificación.....	9
2.2.2. Sintomatología	12
2.2.3. Diagnóstico	13
2.2.4. Tratamiento.....	13
2.3. Mucopolisacaridosis.....	15
3. GLICOSAMINOGLICANOS	17
4. MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA	19
4.1. Prevalencia de la MPS IVA	19
4.2. N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS)	20
4.2.1. Gen codificante para la proteína GALNS humana.....	20
4.2.2. Enzima GALNS.....	23
4.2.3. Mutaciones en el gen <i>GALNS</i> humano	25
4.3. Correlación genotipo-fenotipo	27
4.4. Acción biológica del Queratán Sulfato.....	27
4.5. Acción biológica del Condroitín 6-Sulfato	28
4.6. Fisiopatología de la MPS IVA.....	28
4.7. Sintomatología de la MPS IVA	29
4.7.1. Síntomas iniciales	29
4.7.2. Anomalías esqueléticas	29
4.7.3. Anomalías no esqueléticas	30

4.7.4. Muerte.....	32
4.8. Diagnóstico de la MPS IVA	32
4.8.1. Diagnóstico convencional.....	32
4.8.2. Diagnóstico postnatal.....	34
4.8.3. Diagnóstico prenatal	34
4.9. Modelos animales de la MPS IVA	35
4.9.1. Terapias para Morquio A.....	38
4.9.2. Tratamiento sintomático.....	38
4.9.2.1. Complicaciones respiratorias	38
4.9.2.2. Complicaciones ortopédicas	38
4.9.3. Trasplante de células madre hematopoyéticas	39
4.9.4. Terapia de reemplazo enzimático	39
4.9.5. Terapias en desarrollo	41
4.9.5.1. Terapia de aumento de actividad enzimática	41
4.9.5.2. Trasplante de células madre mesenquimales de cordón umbilical	42
4.9.5.3. Terapia de degradación de sustrato.....	42
5. TERAPIA GÉNICA	43
5.1. Vectores virales adeno-asociados.....	44
5.1.1. Biología de los virus adeno-asociados	44
5.1.2. Características de los vectores AAVs.....	47
6. TERAPIA GÉNICA PARA LA MPS IVA	49
6.1. Transferencia génica con vectores retrovirales y lentivirales.....	49
6.2. Terapia génica con vectores adeno-asociados	49
III. OBJETIVOS.....	51
IV. RESULTADOS	53

Parte 1. Generación y caracterización del modelo murino de MPS IVA

1. GENERACIÓN DE UN RATÓN DEFICIENTE EN <i>Galns</i>.....	55
2. ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL RATÓN MPS IVA	57
2.1. Evaluación del fenotipo esquelético	57
2.1.1. Determinación de actividad GALNS en el fémur y del contenido de GAGs en la placa de crecimiento	57
2.1.2. Estudio de microtomografía computarizada de hueso de ratón MPS IVA	59
2.1.3. Análisis morfológico de huesos de ratones MPS IVA de 12 meses de edad	59
2.1.4. Evaluación del crecimiento del ratón MPS IVA.....	61
2.2. Evaluación del fenotipo somático	62
2.3. Evaluación del fenotipo ocular.....	66
2.4. Patología del sistema nervioso central	71
2.5. Supervivencia del modelo murino MPS IVA	77

Parte 2. Estudio de la distribución de vectores AAV-GFP tras una administración intravenosa

1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS VECTORES VIRALES AAV8 Y AAV9 ADMINISTRADOS POR VIA INTRAVENOSA PARA TRANSDUCIR LOS PRINCIPALES TEJIDOS AFECTADOS EN LA ENFERMEDAD DE MORQUIO A.....	79
1.1. Análisis inmunohistoquímico del hueso.....	80
1.2. Análisis de expresión del transgén.....	88

Parte 3. Tratamiento del modelo animal murino de MPS IVA con el vector
AAV9

1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR VIRAL ADENOSOCIADO DE SEROTIPO 9 CODIFICANTE PARA LA PROTEÍNA GALNS MURINA	92
2. INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD GALNS EN EL SISTEMA ESQUELÉTICO TRAS LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DEL VECTOR AAV9-GALNS.....	93
3. EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DEL VECTOR AAV9-CAG-omGALNS.....	95
3.1. Incremento de la actividad GALNS y corrección del contenido de GAGs en tejidos somáticos.....	96
3.2. Corrección de la patología ocular	102
3.3. Efecto del tratamiento sobre la patología del sistema nervioso central.....	105
4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS DE MANTENER LOS NIVELES SÉRICOS DE GALNS ELEVADOS EN AUSENCIA DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA POR PARTE DEL HÍGADO.....	108
4.1. Construcción y administración del vector viral AAV9-GALNS-MiRT	110
V. DISCUSIÓN.....	113
VI. CONCLUSIONES	125
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	128
1. MATERIALES	129
1.1. Animales	129
1.2. Cepas bacterianas	130
1.3. Anticuerpos	130
1.4. Plásmidos	130
1.5. Reactivos	131

2. MÉTODOS.....	132
2.1. Análisis del cariotipo de mESC	132
2.2. Técnicas de manipulación del DNA.....	132
2.2.1. Preparación del DNA plasmídico.....	132
2.2.2. Digestión del DNA con enzimas de restricción	133
2.2.3. Desfosforilación del fragmento de DNA.....	133
2.2.4. Generación de extremos romos en fragmentos de DNA	133
2.2.5. Ligación de fragmentos de DNA.....	134
2.2.6. Transformación en células competentes <i>E. coli</i> XL2Blue	134
2.2.7. Purificación y resolución del DNA	135
2.3. Técnicas de obtención y manipulación del RNA.....	135
2.3.1. Aislamiento y purificación de RNA total.....	135
2.3.2. Síntesis de cDNA.....	136
2.3.3. Cuantificación de la expresión de mRNA por PCR cuantitativa	136
2.4. Construcción de plásmidos	137
2.4.1. Optimización de las secuencias de DNA.....	138
2.4.2. Construcción del plásmido pAAV-CAG-omGALNS	138
2.4.3. Construcción del plásmido pAAV-CAG-omGALNS-MiRT122a.....	138
2.5. Producción, purificación y titulación de vectores virales adeno-asociados ..	139
2.5.1. Producción y purificación	139
2.5.2. Titulación de genomas virales	140
2.5.3. Cuantificación de las partículas virales por tinción de plata.....	142
2.6. Genotipación de los ratones.....	143
2.6.1. Purificación de DNA genómico.....	144
2.6.2. Genotipación por PCR	144
2.7. Administración intravenosa de vectores AAV	145
2.8. Obtención de muestras de suero de ratones.....	146
2.9. Eutanasia y obtención de muestras biológicas <i>post mortem</i> de ratones ...	146

2.10. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford.....	146
2.11. Determinación de actividad GALNS.....	147
2.12. Determinación del contenido de GAGs	148
2.13. Inmunohistoquímica de secciones tisulares en bloques de parafina	149
2.14. Tinción de Mowry de secciones de ojos en bloques de parafina.....	149
2.15. <i>Tinción In-toto</i> con X-gal	150
2.16. Determinación del área positiva en inmunohistoquímica y tinciones en campo claro.....	150
2.17. Microscopia electrónica de transmisión.....	150
2.18. Tinción <i>Toluidine-Blue</i> en secciones semifinas	151
2.19. Análisis de la fluorescencia específica de GFP.....	151
2.20. Análisis estadístico	151
VIII. BIBLIOGRAFIA	152

I. Presentación

La Mucopolisacaridosis tipo IVA (MPS IVA) o Síndrome de Morquio A es una enfermedad de acumulación lisosomal de herencia autosómica recesiva, causada por la deficiencia en la enzima lisosomal N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS). Esta sulfatasa está involucrada en la degradación de los glicosaminoglicanos (GAGs) Queratán Sulfato (QS) y Condroitín 6-sulfato (C6S). Los principales signos clínicos de la MPS IVA son: (i) una corta estatura, (ii) displasia esquelética, (iii) anomalías en la dentición y (iv) opacidad corneal. La esperanza de vida de estos pacientes no suele superar la segunda o tercera década de vida, aunque hay constancia de pacientes con fenotipos atenuados que han superado los 70 años.

Actualmente, no hay ninguna terapia aprobada capaz de revertir todos los aspectos clínicos de la enfermedad. Por esta razón, se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La terapia génica *in vivo* basada en la administración de vectores virales derivados de los virus adenoasociados (AAV) ofrecen una alternativa atractiva para el tratamiento de enfermedades minoritarias de origen genético, como la MPS IVA.

Por este motivo, el principal objetivo de la presente tesis doctoral fue el desarrollo de una aproximación de terapia génica para el tratamiento de la Mucopolisacaridosis tipo IVA. Para ello, en primer lugar, se generó y caracterizó un ratón modelo de la MPS IVA. Este modelo no desarrolló la patología esquelética característica de la enfermedad de Morquio. Sin embargo, el ratón modelo MPS IVA sí que fue capaz de desarrollar otros aspectos fenotípicos característicos de la enfermedad, tales como la acumulación de GAGs en diferentes órganos periféricos y una marcada opacidad corneal. Además, el ratón MPS IVA mostró diversas alteraciones a nivel del sistema nervioso central (SNC).

Con el fin de desarrollar una aproximación de terapia génica con el vector más adecuado, se realizó un estudio de biodistribución para determinar el vector capaz de transducir de forma más eficiente el hueso y otros órganos y tejidos afectados en la enfermedad de Morquio A. Los resultados obtenidos en el estudio de biodistribución, especialmente a nivel del sistema esquelético, junto con la evidencia de alteraciones a nivel del SNC hicieron que finalmente se optase por el vector adenoasociado de serotipo 9 (AAV9), debido a su elevada capacidad para transducir los principales órganos y tejidos afectados en los pacientes de Morquio A y a su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica.

Por lo tanto, en la presente tesis doctoral se ha desarrollado una estrategia de terapia génica centrada en la administración intravenosa o sistémica de un vector AAV9

codificante para la proteína GALNS murina (AAV9-GALNS), con la finalidad de tratar las alteraciones fenotípicas observadas en el ratón MPS IVA.

Una única administración sistémica del vector viral AAV9-GALNS en ratones modelo de la MPS IVA, permitió incrementar la actividad GALNS en diversos órganos y tejidos, como el fémur, el hígado, el corazón, el tejido adiposo, el suero y el cerebro. Dada la falta de fenotipo esquelético en el ratón MPS IVA, no se pudo evaluar la eficacia de la terapia a este nivel. En cambio, a nivel somático, el aumento de actividad GALNS en ratones MPS IVA tratados permitió normalizar el contenido de QS en todos los tejidos periféricos analizados. Además, el tratamiento con el vector terapéutico permitió la normalización del depósito de GAGs presentes en el epitelio corneal de ratones MPS IVA y en las células alveolares de las glándulas lagrimales. A nivel del SNC, el aumento de actividad GALNS en el cerebro de ratones MPS IVA tratados permitió normalizar el contenido de QS y corregir los signos de neuroinflamación.

Conjuntamente, los resultados mostraron la eficacia terapéutica de la administración intravenosa de vectores AAV9 codificantes para la proteína GALNS. A pesar de la necesidad de estudiar dicha terapia en modelos animales de MPS IVA que desarrollen la patología esquelética de Morquio A, la estrategia de terapia génica descrita en este trabajo puede constituir la base preclínica para la translación hacia la clínica de la administración sistémica del AAV9-GALNS como tratamiento para la MPS IVA.

II. Introducción

1. ENFERMEDADES RARAS

Las enfermedades raras, o minoritarias son aquellas enfermedades que tienen una baja incidencia en la población. Para ser considerada como rara, cada enfermedad específica sólo puede afectar a un número limitado de personas. No hay un consenso único y aceptado para clasificar una enfermedad como enfermedad rara o minoritaria. Así, en Estados Unidos la frecuencia de una enfermedad para ser considerada como rara es de 1:200.000, en Japón la frecuencia requerida es de 1:50.000 y en Europa, de 1:2.000 habitantes (International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs (ICORD), 2012).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen cerca de 7.000 enfermedades raras que afectan al 7% de la población mundial. A nivel español hay 3 millones de personas afectadas por una de estas enfermedades y 27 millones a nivel europeo, y se estima unos 350 millones de afectados a nivel mundial.

El 80% de estas enfermedades son de carácter genético, mientras que el 20% restante son debidas a trastornos adquiridos como puede ser una infección vírica, una alergia u otra causa ambiental. La mayoría de estas enfermedades tienen un inicio precoz en la vida de los pacientes: 2 de cada 3 aparecen antes de los dos años de edad. Las enfermedades minoritarias son, en su mayor parte, crónicas y degenerativas. De hecho, el 65% de estas patologías son graves e invalidantes.

1.1. Medicamentos huérfanos

Según la organización de Enfermedades Raras en Europa (Eurodis), los medicamentos huérfanos son productos medicinales que sirven para diagnosticar, prevenir o tratar enfermedades o desórdenes que amenazan la vida o que son muy graves y que son muy poco frecuentes. A estos medicamentos se les llama “huérfanos” debido al poco interés por parte de las industrias farmacéuticas, bajo las condiciones normales del mercado, en desarrollar y comercializar productos dirigidos a enfermedades con una incidencia tan baja. El pequeño tamaño del público al que van dirigidos no permitiría recuperar el capital invertido en la investigación y en el desarrollo del producto. Por esta razón, uno de los incentivos que se otorgan con la designación de medicamento huérfano, entre otros, es la reducción/exención de tasas en muchos de los procedimientos de desarrollo.(Ciberer, 2016)

2. LISOSOMAS Y ENFERMEDADES POR DEPÓSITO LISOSOMAL

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal o por depósito lisosomal (LSDs: *Lysosomal Storage Disorders*) son un grupo de aproximadamente 50 enfermedades raras que resultan en alteraciones de la función lisosomal. Estas alteraciones son causadas por defectos genéticos en genes codificantes para enzimas lisosomales, sus cofactores o en proteínas involucradas en el transporte de proteínas al lisosoma. Como consecuencia, moléculas parcialmente digeridas o sustratos enteros son acumulados progresivamente en el interior de estos orgánulos, de ahí la nomenclatura de enfermedad por depósito lisosomal (Winchester et al., 2000).

2.1. Lisosomas y enzimas lisosomales

El término lisosoma proviene del griego y significa cuerpo digestivo. Los lisosomas son orgánulos intracelulares descritos por primera vez en 1955 por Christian de Duve (de Duve, 2005). Estos orgánulos presentan un lumen ácido (pH 4,5-5,0) limitado por una bicapa lipídica. En su interior contiene gran cantidad de hidrolasas que están involucradas en la digestión de diferentes sustratos. La entrada de sustratos a estos orgánulos se lleva a cabo por procesos de endocitosis, en el caso de que el sustrato sea extracelular, o por autofagia si el sustrato es intracelular. Además de captar sustratos, estos orgánulos también son capaces de liberar productos al medio extracelular fusionando su membrana con la membrana plasmática de la propia célula, proceso conocido como exocitosis (Settembre et al., 2013).

Los lisosomas presentan 2 clases de proteínas que son esenciales para su correcto funcionamiento: hidrolasas ácidas y proteínas integrales de la membrana lisosomal (LMPs: *Lysosomal Membrane Proteins*) (Saftig and Klumperman, 2009). Entre las aproximadamente 60 hidrolasas ácidas conocidas del lisosoma, (Xu and Ren, 2015) existen tipos muy diversos como sulfatasas, glucosidasas, peptidasas, fosfatasas, lipasas y nucleasas. Todas ellas permiten al lisosoma degradar un amplio repertorio de sustratos biológicos (Settembre et al., 2013) y son únicamente activas en el lisosoma gracias al pH ácido de su interior. Esta característica protege a la célula de una posible auto digestión incontrolada por posibles roturas de la membrana lisosomal, ya que el pH del citoplasma es de ~7,2. Por su parte las LMPs se encuentran en la membrana lisosomal y están involucradas en diversas funciones como la acidificación del lumen lisosomal, autofagia o exocitosis y transporte a través de la membrana lisosomal. Entre las LMPs más abundantes se encuentran las proteínas lisosomales asociadas a

membrana tipo 1 (LAMP-1: *Lysosomal-associated membrane protein 1*) y tipo 2 (LAMP-2: *Lysosomal-associated membrane protein 2*) (Saftig and Klumperman, 2009).

Las enzimas lisosomales son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso en su forma inactiva y son translocadas hacia el retículo endoplasmático liso gracias a un péptido señal. En este nuevo orgánulo pierden el péptido señal y reciben glucosilaciones en el extremo N-terminal. Posteriormente son transportadas al Aparato de Golgi (AG) donde reciben una nueva modificación post-transcripcional que en este caso consiste en la unión de residuos de manosa 6-fostato (M6P) mediante la acción de fosfotranferasas y diesterasas, residuos totalmente necesarios para su direccionamiento hacia los lisosomas (Reitman L and Kornfeld, 1981; Varki and Kornfeld, 1981; Waheed et al., 1981) (Figura 1).

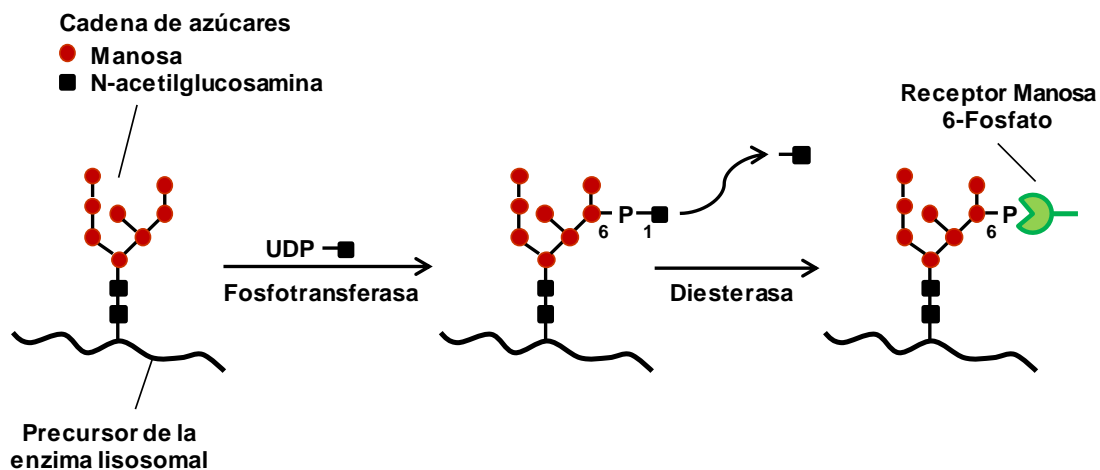


Figura 1. Formación de la etiqueta manosa 6-fosfato en el aparato de golgi para dirigir las enzimas lisosomales a los lisosomas. En primer lugar, actúa la fosfotransferasa que se encarga de la fosforilación de la posición 6 de la manosa. Consecutivamente, la diesterasa rompe el enlace fosfodiéster entre el grupo fosfato y la N-acetilglucosamina. Adaptado de (Vellodi, 2005).

Estos residuos son reconocidos por receptores de manosa 6-fosfato (M6PR) en el *trans* Golgi donde se empaquetan en vesículas de clatrina, las cuales se fusionarán con los endosomas. En el interior de éstos, los M6PR se liberarán de sus ligandos por acidificación del medio y podrán ser reciclados nuevamente hacia el AG o hacia la membrana plasmática de la célula (Figura 2) (Hille-Rehfeld, 1995). Finalmente, los endosomas se fusionarán con los lisosomas, donde las enzimas se someterán a los últimos pasos de maduración mediante procesos de proteólisis, plegamiento y agregación para adquirir su forma plenamente activa. Esta vía de obtención de hidrolasas se conoce como vía directa. Sin embargo, éstas también pueden ser captadas por vía indirecta mediante endocitosis a través de M6PR presentes en la

membrana plasmática de la célula. Estos receptores son capaces de captar aquellas enzimas con el ligando M6P que se encuentran en el medio extracelular. Las hidrolasas ácidas sintetizadas en una célula no sólo pueden llevar a cabo su acción en esa misma célula, sino que también pueden ser secretadas al medio extracelular o al riego sanguíneo para ser captadas por una célula que presente el M6PR en su membrana plasmática (Desnick and Schuchman, 2002; Saftig and Klumperman, 2009) (Figura 2).

Esta forma indirecta de adquisición de las enzimas lisosomales permite la conocida corrección cruzada o *cross-correction*, del término en inglés. Este fenómeno consiste en el hecho de que las enzimas lisosomales no sólo actúan en la misma célula productora sino que también pueden hacerlo en otras células deficientes de estas enzimas (Figura 2) (Enns and Huhn, 2008).

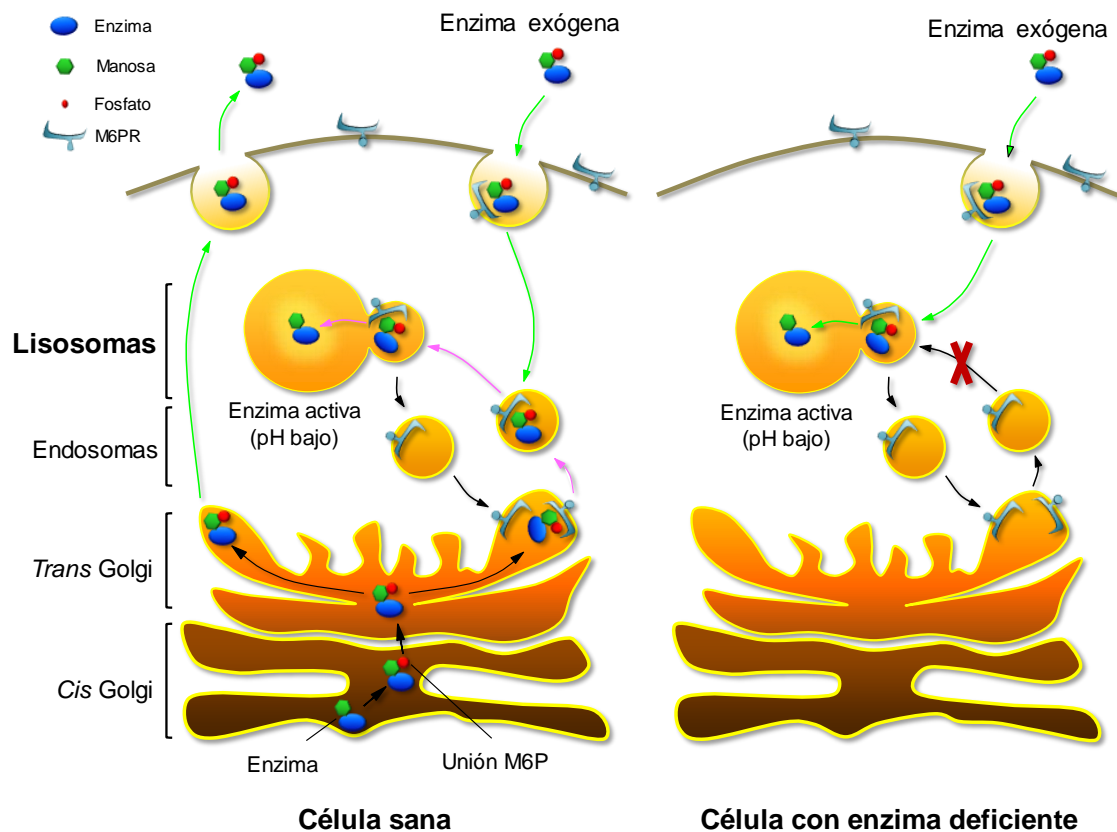


Figura 2. Mecanismo de corrección cruzada. Las hidrolasas ácidas producidas en una célula pueden ejercer su función en la misma célula que las sintetiza (vía directa, flechas rosas) o ser secretadas al medio extracelular y al riego sanguíneo, pudiendo ser captadas por células vecinas o distantes que expresen el M6PR en su membrana plasmática, y ejercer su función digestiva en estas células (vía indirecta, flechas verdes). La eficacia de la mayoría de aproximaciones terapéuticas en estudios preclínicos se basa en esta propiedad.

2.2. Enfermedades por depósito lisosomal

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las LSDs comprenden un grupo de al menos, 50 enfermedades genéticas causadas por deficiencia de una proteína o actividad enzimática particular del lisosoma. La mayoría de estas enfermedades presentan una herencia autosómica recesiva, con la excepción del Síndrome de Hunter o Mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) y la enfermedad de Fabry, que muestran una herencia recesiva ligada al cromosoma X; y la enfermedad de Danon, que muestra una herencia dominante ligada al cromosoma X (Wilcox, 2004).

Las LSDs son consideradas enfermedades raras o minoritarias, ya que presentan una incidencia inferior a 1 de cada 2.000 habitantes. No hay un consenso claro para definir la incidencia exacta para cada una de ellas, ya que ésta depende del área geográfica estudiada y de la eficiencia en su diagnóstico. La incidencia combinada de todas las LSDs se estima que es, aproximadamente, 1 de cada 5.000 nacimientos vivos (Fuller et al., 2006), aunque, probablemente, ésta aumentaría si se tuviesen en cuenta todos los casos no diagnosticados o mal diagnosticados.

2.2.1. Clasificación

Aunque cada LSD está causada por mutaciones en un gen determinado, la consecuencia de estas mutaciones lleva a las LSDs a compartir la misma característica bioquímica: acumulación de sustratos dentro de los lisosomas. Esta acumulación acaba provocando distensión lisosomal y como consecuencia daño celular progresivo, que acaba dando lugar a la muerte celular y a fallos sistémicos. Todos estos problemas, que en la mayoría de casos, acaban provocando una reducción de la esperanza de vida de los pacientes (Muenzer, 2011; Neufeld and Muenzer, 2001). El tipo de sustrato que se acumula es utilizado para clasificar las distintas LSDs (Tabla 1). Algunas de las LSDs son clasificadas en subtipos en función de su severidad, como es el caso de Hurler/Scheie para la mucopolisacaridosis tipo I o MPS I; del momento de aparición de la enfermedad, como es el caso de las formas infantil/juvenil/adulta de la enfermedad de Pompe o del gen mutado encargado de la degradación del sustrato, como es el caso de los subtipos A, B, C y D de la mucopolisacaridosis tipo III o MPS III.

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades por depósito lisosomal (Parte I)

Enfermedad	Otros nombres	Proteína deficitaria	Productos acumulados
Defectos en la degradación de Glicoproteínas			
Mucopolipidosis I (tipo I y II)	Sialidosis	α -N-acetilneuraminidasa	Sialil-oligosacáridos
Galactosialidosis		Catepsina A	Sialil-oligosacáridos
α -Manosidosis		α -manosidasa	Oligosacáridos con manosa
β -Manosidosis		β -manosidasa	Oligosacáridos con manosa
Aspartilglucosaminuria		Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosamina
α -Fucosidosis		α -L-fucosidasa	Oligosacáridos con fucosa
Enfermedad de Schindler		α -N-acetilgalactosaminidasa	Oligosacáridos con N-acetilgalactosamina
Defectos en la degradación de Glicolípidos			
GM1 Gangliosidosis (tipo I, II y III) ^a		β -galactosidasa	Gangliósidos GM1
GM2 Gangliosidosis - Tay-Sachs	Enfermedad de Tay-Sachs	β -hexosaminidasa (subunidad α)	Gangliósidos GM2
GM2 Gangliosidosis - Sandhoff	Enfermedad de Sandhoff	β -hexosaminidasa (subunidad β)	Gangliósidos GM2
GM2 Gangliosidosis (variante AB)	Tay-Sachs (variante AB)	Proteína activadora de GM2	Gangliósidos GM2
Enfermedad de Gaucher (tipo I, II y III) ^b		Glucocerebrosidasa	Glucosilceramidas
Enfermedad de Gaucher (variante)		Saponsin C	Glucosilceramidas
Leucodistrofia Metacromática		Arlsulfatasa A	Glicolípidos sulfatados
Leucodistrofia Metacromática (variante)		Saponsin B	GM1 y Glicolípidos sulfatados
Deficiencia múltiple de Sulfatasas	Enfermedad de Austin / Mucosulfatidosis	c- α -formylglycine-generating enzyme	Galactocerebrósidos sulfatados
Leucodistrofia de células globoides	Enfermedad de Krabbe	β -galactosilceramidasa	Galactosilceramidas
Enfermedad de Fabry		α -galactosidasa A	Globotriaosilceramidas
Enfermedad de Fabry (variante) ^c		α -galactosidasa A	Globotriaosilceramidas
Defectos en la degradación de Mucopolisacáridos - Mucopolisacaridosis			
MPS I	Síndrome de Hurler, Scheie y Hurler/Scheie ^d	α -iduronidasa	Dermatán y Heparán sulfato
MPS II	Síndrome de Hunter	Iduronato-2-sulfatasa	Dermatán y Heparán sulfato
MPS III	Síndrome de Sanfilippo		
MPS IIIA	Síndrome de Sanfilippo A	Heparán N-sulfatasa	Heparán sulfato
MPS IIIB	Síndrome de Sanfilippo B	α -N-acetilglucosaminidasa	Heparán sulfato
MPS IIIC	Síndrome de Sanfilippo C	Acetil-CoA: α -glucosaminidasa N-acetiltransferasa	Heparán sulfato
MPS IIID	Síndrome de Sanfilippo D	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparán sulfato
MPS IV	Síndrome de Morquio		
MPS IVA	Síndrome de Morquio A	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa	Queratán y Condroitín sulfato
MPS IVB	Síndrome de Morquio B	β -galactosidasa	Queratán sulfato
MPS VI	Síndrome de Morateaux-Lamy	Arylsulfatasa B	Dermatán Sulfato
MPS VII	Síndrome de Sly	β -glucuronidasa	Heparán, Dermatán y Condroitín sulfato
MPS IX		Hialuronidasa	Ácido hialurónico

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades por depósito lisosomal (Parte II)

Enfermedad	Otros nombres	Proteína deficitaria	Productos acumulados
Defectos en la degradación del Glucógeno			
Glucogenosis tipo II	Enfermedad de Pompe	α -glucosidasa	Glucógeno
Defectos en la degradación o transporte de Lípidos			
Enfermedad de Niemann-Pick tipo A y B ^e		Esfingomielinasa	Esfingomielina
Enfermedad de Niemann-Pick C1		NPC1	Colesterol y Esfingolípidos
Enfermedad de Niemann-Pick C2		NPC2	Colesterol y Esfingolípidos
Lipogranulomatosis de Farber	Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida	Ceramida
Enfermedad de Wolman		Lipasa ácida lisosomal	Triglicéridos y ésteres de colesterol
Lipofuscinosis neuronal cerioidea (NCL)			
NCL1		Palmitoil-proteína tioesterasa	Lipofuscina
NCL2	Enfermedad de Jansky-Bielschowsky	Tripeptidil peptidasa 1	Lipofuscina
NCL3	Enfermedad de Batten	Batenina	Lipofuscina
NCL4		DNAJC5	Lipofuscina
NCL5		NCL5	Lipofuscina
NCL6		NCL6	Lipofuscina
NCL7		MFSD8	Lipofuscina
NCL8		NCL8	Lipofuscina
Defectos en la degradación de Polipéptidos			
Picnodisostosis	Síndrome de Toulouse-Lautrec	Catepsina K	Proteínas óseas
Defectos en Transportadores Lisosomales			
Cistinosis		Cistinosina (Transportador lisosomal de cistina)	Cistina
Enfermedad de Salla	Sialuria	Sialina	Sialil-oligosacáridos
Defectos en proteínas implicadas en el tráfico lisosomal			
AMRS	Arthrogryposis, mental retardation, seizures	Transportador UDP-N-acetilglucosamina	N-Glicanos ramificados
Mucopolidosis II - III			
Mucopolidosis II - III α/β	Polidistrofia pseudo-Hurler	N-Acetilglucosamina-1-Fosfato Transferasa	Oligosacáridos, Mucopolisacáridos y Lípidos
Mucopolidosis II - III γ		N-Acetilglucosamina-1-Fosfato Transferasa	Oligosacáridos, Mucopolisacáridos y Lípidos
Mucopolidosis IV	Sialolipidosis	Mucopolidina-1	Mucopolisacáridos y Lípidos
Enfermedad de Danon	Pseudoglucogenosis tipo II	LAMP-2	Glucógeno y debriscitoplasmático
Síndrome de Chédiak-Higashi		LYST	Varios productos
Síndrome de Griscelli			
Síndrome de Griscelli tipo 1		MYO5A	Varios productos
Síndrome de Griscelli tipo 2	Síndrome de Paid	RAB27A	Varios productos
Síndrome de Griscelli tipo 3		Melanofilina	Varios productos
Síndrome de Hermansky-Pudlak		HPS1	Lipofuscina

^aDiferentes subtipos según la severidad de la enfermedad y la actividad residual de la enzima, siendo la tipo I la más severa y de inicio más temprano. La tipo III es la más leve y de inicio en la edad adulta.

^bDiferentes tipos según el grado de afectación neuropática. Tipo I: sin afectación; tipo II: afectación neuropática aguda; tipo III: afectación neuropática subaguda.

^cVariante de la Enfermedad de Fabry de muy baja prevalencia con afección cardíaca.

^dHurler: variante más severa; Scheie: variante más leve; Hurler/Scheie: variante de severidad moderada.

^eTipo A: forma severa, de aparición infantil y con severa afectación neurológica. Tipo B: variante de inicio en la edad adulta y sin afectación neurológica.

Adaptado de (Futerman and van Meer, 2004; Tollersrud and Berg, 2005; Wilcox, 2004).

2.2.2. Sintomatología

Las LSDs presentan un amplio espectro de fenotipos clínicos (Tabla 2). La mayoría de los pacientes con enfermedades por depósito lisosomal nacen aparentemente sanos y los síntomas aparecen de forma progresiva. La velocidad y severidad de aparición de los síntomas depende de muchos factores: el sustrato que se acumula, el tipo celular en el que se produce este depósito o la mutación genética causante de la enfermedad (Tollersrud and Berg, 2005). Diferentes mutaciones en un mismo gen pueden dar lugar a una forma más o menos severa de una misma enfermedad y provocar una aparición más o menos temprana de ésta, ya que pueden provocar una mayor o menor pérdida del grado de funcionalidad de la proteína (Caciotti et al., 2011).

La mayoría de LSDs presentan afectación del sistema nervioso central (SNC) provocando neurodegeneración en múltiples regiones del cerebro como el tálamo, el córtex, el hipocampo y el cerebelo (Platt et al., 2012). A nivel periférico, la mayoría de estas enfermedades se caracterizan principalmente por organomegalias (hepatoesplenomegalia), anomalías esqueléticas y rasgos faciales toscos.

Tabla 2. Ejemplos de enfermedades de acúmulo lisosomal y principales órganos afectados.

Enfermedad	Principal órgano o sistema periférico afectado	Patología en el SNC
Deficiencia de enzimas lisosomales		
Aspartilglucosaminuria	Esqueleto y tejido conectivo	Sí
Enfermedad de Fabry	Riñón y corazón	No
Enfermedad de Gaucher (tipo I, II y III)	Bazo, hígado y médula ósea	Sí ^a
GM1 Gangliosidosis (tipo I, II y III)	Esqueleto y corazón	Sí
Leucodistrofia de células globoides	Corazón	Sí
Leucodistrofia Metacromática	-	Sí
Mucopolisacaridosis	Cartílago, hueso, corazón y pulmones	Sí ^b
Deficiencia múltiple de Sulfatasas	Bazo, hígado, huesos y piel	Sí
Glucogenosis tipo II	Músculo esquelético	No
GM2 Gangliosidosis - Sandhoff	-	Sí
Deficiencia de proteínas implicadas en el tráfico lisosomal		
Mucopolipidosis II - III	Esqueleto y corazón	Sí
Deficiencia de proteínas lisosomales no enzimáticas		
Enfermedad de Niemann-Pick C2	Hígado	Sí
Deficiencia de proteínas lisosomales de membrana		
Cistinosis	Riñón y ojo	No
Enfermedad de Danon	Músculo esquelético y cardíaco	Sí
Enfermedad de Salla	Hígado, bazo y esqueleto	Sí
Mucopolipidosis IV	Ojo	Sí
Enfermedad de Niemann-Pick C1	Hígado	Sí

^aTipo II y III.

^bLa mayoría de MPSS.

Adaptado de (Platt et al., 2012)

2.2.3. Diagnóstico

La baja frecuencia de las LSDs y la gran diversidad en la sintomatología hace que, en muchos casos, estos pacientes sean inicialmente mal diagnosticados.

El diagnóstico bioquímico de las LSDs en pacientes pediátricos y adultos se realiza mediante el procesamiento de muestras de sangre, orina o biopsias de piel. Estos test, normalmente, se llevan a cabo en pacientes menores de 5 años en los que la sintomatología clínica sugiere hacer un cribado de enfermedades por depósito lisosomal (Wenger et al., 2002).

Una vez la sintomatología clínica ha generado la duda de una posible LSD, el primer paso en el diagnóstico, generalmente, consiste en un análisis de orina para macromoléculas específicas no degradadas, como pueden ser los glicosaminoglicanos (GAGs), los oligosacáridos o los ácidos siálicos libres. Este análisis proporciona un primer diagnóstico, aunque puede llevar a falsos negativos, especialmente en pacientes con fenotipos muy atenuados. En estos casos en los que la sintomatología hace pensar firmemente en la presencia de una LSD, pero el análisis de orina es normal, se debe realizar un análisis enzimático en suero o biopsia de piel.

En este tipo de enfermedades el diagnóstico precoz es crucial para que el tratamiento sea lo más efectivo posible, sobre todo en aquellos casos en los que hay que prevenir la neurodegeneración o alteración de las placas de crecimiento del hueso. Por este motivo se están empezando a desarrollar test de diagnóstico neonatales (NBS *new born screening*) mediante gota de sangre coagulada. Inicialmente estos test intentaban identificar una mayor cantidad de proteína LAMP1, indicativo de abundancia y distensión lisosomal, aunque no han sido del todo efectivos, a excepción de la mucopolidosis II/III y la enfermedad de Fabry (Meikle, 2004). Actualmente los NBS que están bajo estudio se basan en la inmunocuantificación de determinados enzimas lisosomales (Chuang et al., 2017; Matern et al., 2015) o en el uso de la espectrometría de masas para la detección de los productos derivados de la actividad de estas enzimas en gota de sangre coagulada (Smith et al., 2018).

2.2.4. Tratamiento

Actualmente, no hay ningún tratamiento definitivo para la mayoría de LSDs y la mayoría de tratamientos que hay disponibles son paliativos y basados principalmente en el tratamiento sintomático.

Las LSDs son un grupo de enfermedades con un espectro sintomatológico muy amplio, aunque la mayoría de ellas comparten una serie de características que las convierten en muy buenas candidatas para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

Una de estas características es la posibilidad de revertir el fenotipo patológico con una recuperación de entre un 10-40% de la actividad total de la enzima deficitaria (Cheng and Smith, 2003; W Rastall and Amalfitano, 2017). Otra característica favorable es el hecho de que las LSDs son generalmente enfermedades monogénicas de herencia recesiva con una fisiopatología, en la mayoría de casos, bien descrita (Futerman and van Meer, 2004). Esta última característica permite la generación de modelos animales para los estudios preclínicos de nuevas aproximaciones terapéuticas. La tercera característica de las LSDs y la más crucial es la posibilidad de la *cross-correction* entre los diferentes órganos y sistemas afectados de un mismo paciente (Enns and Huhn, 2008).

A pesar de todas estas ventajas, el tratamiento de las LSDs tiene diversas complicaciones a tener en cuenta. En los tratamientos que conllevan la introducción de proteínas u otro agente extraño en el organismo, la principal complicación es la respuesta inmune que este material puede generar en el paciente (Bali et al., 2012; Berrier et al., 2015). Otra de las complicaciones es la capacidad de recuperación de los órganos afectados, ya que la nueva terapia puede conseguir restablecer el buen funcionamiento de un órgano o simplemente frenar el deterioro de éste sin posibilidad de recuperación de las funciones perdidas (Leone et al., 2012; Schiffmann et al., 2008; Weidemann et al., 2009). Otro factor a tener en cuenta en las LSDs es la desregulación de muchos procesos de tráfico celular que pueden afectar a la farmacocinética y, por lo tanto, al efecto terapéutico de muchos fármacos (Futerman and van Meer, 2004). Además de todas estas complicaciones, hay que tener en cuenta otros factores a nivel celular que también complican el tratamiento de las LSDs, como pueden ser la alteración de la homeóstasis del calcio, la inflamación o la autofagia (Vitner et al., 2010). En el caso de aquellas LSDs en las que hay afectación del SNC, la dificultad añadida radica en la incapacidad de la mayoría de tratamientos de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE), limitando así las opciones terapéuticas para la neuropatía (Rastall and Amalfitano, 2015).

Dentro de estos tratamientos encontramos: (i) la terapia de reemplazo enzimático o *ERT* de sus siglas en inglés (*Enzyme Replacement Therapy*), que consiste en la administración de una versión funcional de la proteína deficitaria o hipoactiva en el

paciente; (ii) la terapia de reducción de sustrato o SRT de sus siglas en inglés (*Substrate Reduction Therapy*), que consiste en, tal y como su nombre indica, tratar las LSDs inhibiendo la producción del sustrato acumulado; (iii) el trasplante de células madre hematopoyéticas, que basa su funcionamiento en el trasplante al paciente de células sanas capaces de producir líneas celulares que producirían la enzima deficiente y esta podría llegar al resto de células del organismo por el mecanismo de corrección cruzada; (iv) terapias específicas de mutación que se basan en el uso de chaperonas, la inducción de lecturas a través de codonones de parada o la introducción de correcciones de *splicing*; (v) terapia génica *in vivo* que se basa en el uso de vectores virales para introducir en las células del paciente una copia corregida del gen mutado en cada enfermedad. Además, existen terapias de soporte tales como la fisioterapia destinadas a paliar algunos de los síntomas de la enfermedad.

2.3. Mucopolisacaridosis

Las Mucopolisacaridosis (MPSs) son un tipo de LSDs causadas por deficiencias en enzimas involucradas en el catabolismo de los mucopolisacáridos o GAGs, lo que comporta su acumulación patológica en el interior de los lisosomas de las células afectadas (Muenzer, 2011; Neufeld and Muenzer, 2001). La acumulación sostenida en el tiempo de GAGs da lugar a un daño celular progresivo que afecta a múltiples tejidos y puede conducir a discapacidad cognitiva, fallo orgánico y reducción significativa de la esperanza de vida. Debido a su baja prevalencia e incidencia, las MPS se incluyen dentro del grupo de las enfermedades minoritarias (Tabla 3).

Exceptuando la MPS II, que tiene una herencia ligada al cromosoma X, el resto de MPSs presentan una herencia autosómica recesiva.

Las MPSs pueden tener diferentes grados de afectación como es el caso de la MPS I, siendo el síndrome de Hurler la forma más severa y de aparición más temprana o el síndrome de Scheie, que es la forma más atenuada y de aparición más tardía. En este caso, la severidad con la que se manifiesta la enfermedad viene ligada principalmente a la mutación genética, que puede dar lugar a una proteína con mayor o menor actividad. En el resto de MPSs la correlación genotipo-fenotipo no es tan evidente (Cimaz et al., 2006; Muenzer, 2011). Esta gran variabilidad en el fenotipo de los pacientes es la principal dificultad a la hora de realizar el diagnóstico (Cimaz and La Torre, 2014).

Tabla 3. Prevalencia en la Unión Europea e Incidencia mundial de los diferentes tipos de MPSs.

Enfermedad	Prevalencia UE ¹ casos por 100.000 nacimientos	Incidencia Global ² casos por 100.000 nacimientos
MPS I (Síndrome de Hurler, Hurler/Scheie, Scheie)	0,25	0,69 - 1,66
MPS II (Síndrome de Hunter)	10	0,30 - 0,71
MPS III (Síndrome de Sanfilippo)	0,3	-
MPS IIIA (Síndrome de Sanfilippo A)	0,32	0,29 - 1,89
MPS IIIB (Síndrome de Sanfilippo B)	0,2	0,42 - 0,72
MPS IIIC (Síndrome de Sanfilippo C)	5	0,07 - 0,21
MPS IIID (Síndrome de Sanfilippo D)	-	0,1
MPS IV (Síndrome de Morquio)	-	-
MPS IVA (Síndrome de Morquio A)	15	0,22 - 1,3
MPS IVB (Síndrome de Morquio B)	-	0,02-0,14
MPS VI (Síndrome de Maroteaux Lamy)	0,16	0,36 - 1,3
MPS VII (Síndrome de Sly)	0,01	0,05 - 0,29
MPS IX	-	4 casos descritos

Prevalencia en la Unión Europea e incidencia mundial de los diferentes tipos de MPSs en diferentes estudios bibliográficos. ¹Adaptado de (Prevalence of Rare Diseases: Bibliographic Data. Orphanet Report Series June, 2017); ²Adaptado de (Muenzer, 2011).

3. GLICOSAMINOGLICANOS

Los glicosaminoglicanos o GAGs, también conocidos como mucopolisacáridos, son las estructuras glucídicas de los proteoglicanos (Figura 3), un tipo de biomoléculas de función principalmente estructural presentes en el tejido conectivo, epitelial, óseo y en el medio intercelular (Ferrier, 2014).

Los mucopolisacáridos son cadenas largas y no ramificadas de heteropolisacáridos, generalmente sulfatados, y compuestas normalmente por una unidad repetitiva de disacárido. Este disacárido suele estar formado por N-acetil-D-glucosamina o N-acetil-D-galactosamina unido a un azúcar ácido que puede ser D-glucurónico o bien L-idurónico, con excepción del queratán sulfato (QS), en el que este último residuo es sustituido por galactosa.

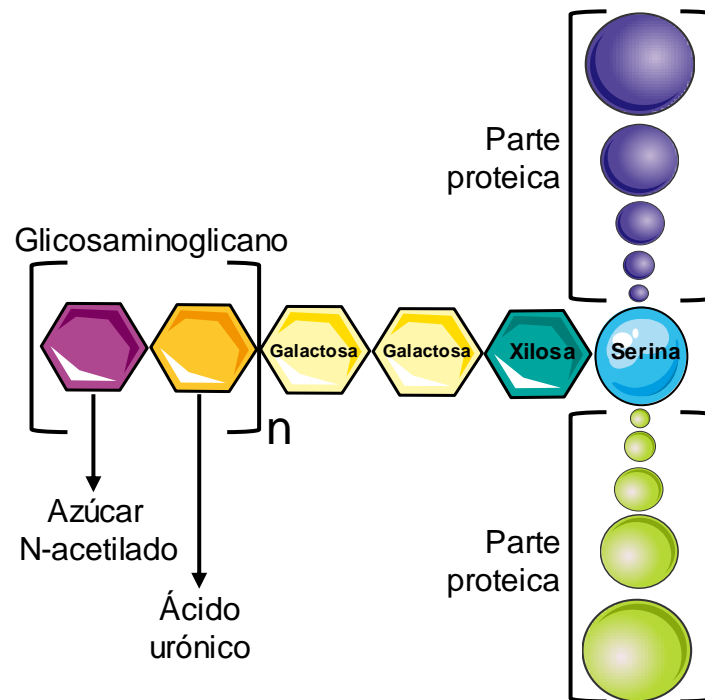
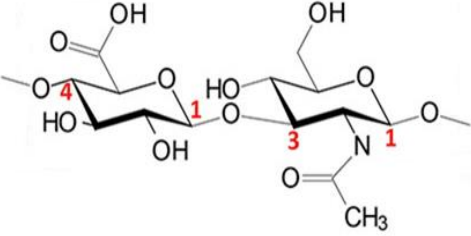
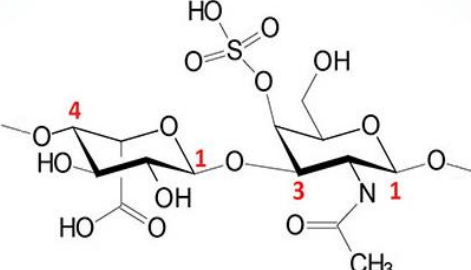
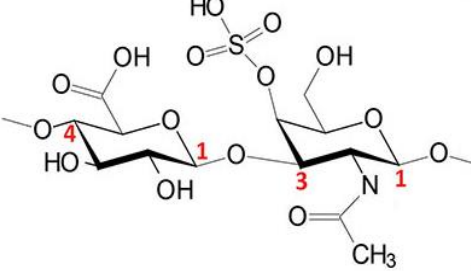
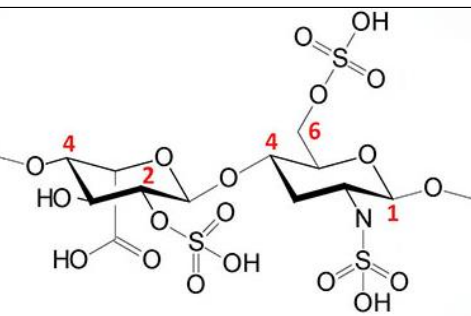
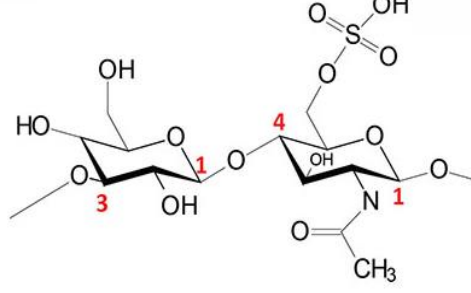


Figura 3. Estructura del proteoglicano. Cada disacárido se repite n veces a lo largo de la estructura del GAG. Los monosacáridos se unen entre ellos por enlaces o-glucosídicos.

En función de su estructura básica repetitiva, los GAGs se clasifican en 4 familias: (i) Hialurónico, (ii) Dermatógeno Sulfato/Condroitín Sulfato, (iii) Heparán Sulfato y (iv) Queratán Sulfato (Tabla 4) (Taylor, 2006).

Tabla 4. Estructura básica de cada glucosaminoglicano.

Disacárido	GAG
	<p>Hialurónico D-Glucurónico + N-acetilglucosamina</p>
	<p>Dermató Sulfato L-Idurónico + D-Glucurónico + N-acetilgalactosamina</p>
	<p>Condroitín Sulfato D-Glucurónico + N-acetilgalactosamina</p>
	<p>Heparán Sulfato L-Idurónico + D-Glucurónico + N-acetilglucosamina</p>
	<p>Queratán Sulfato Galactosa + N-acetilglucosamina</p>

4. MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA

Dentro de las mucopolisacaridoses, la mucopolisacaridosis IV o Síndrome de Morquio se divide en 2 subtipos: A y B. El subtipo A es conocido como Síndrome de Morquio A o MPS IVA y es causado por la deficiencia de la enzima lisosomal N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS, EC 3.1.6.4) (Singh et al., 1976), mientras que el subtipo B es conocido como Síndrome de Morquio B o MPS IVB y es causado por la deficiencia de la enzima lisosomal β -Galactosidasa. Ambos subtipos presentan una herencia autosómica recesiva.

En el caso de la MPS IVA la enzima GALNS es una sulfatasa que participa en la vía de degradación de los GAGs: Condroitín 6-sulfato (C6S) y Queratán sulfato (QS).

El primer caso de MPS IVA fue descrito por el pediatra L. Morquio, en Uruguay en 1929 (Morquio, 1929). Los principales aspectos clínicos de este tipo de pacientes son la corta estatura, displasia esquelética, anomalías en la dentición y opacidad corneal. A diferencia de la mayoría de MPSs, este tipo no presenta afectación directa del SNC, aunque los problemas esqueléticos pueden tener como efecto secundario complicaciones a nivel neuronal, principalmente por compresiones medulares. Los pacientes de Morquio A nacen aparentemente sanos y no es hasta los 2-3 años de edad cuando empiezan a aparecer los primeros signos y síntomas clínicos. Estas primeras evidencias aparecen a nivel esquelético: *genu valgum*, cifosis, *pectus carinatum*, laxidad de las articulaciones, corta estatura, marcha anormal y daños medulares (Montaño et al., 2007). Existe una gran variabilidad en la severidad en la que se puede presentar la enfermedad, por lo que se podría clasificar en 3 subgrupos que se diferencian principalmente por la estatura de los pacientes: (i) severo (< 120 cm), (ii) intermedio (120 – 140 cm) y (iii) atenuado (> 140 cm) (Montaño et al., 2007; Nelson et al., 1988). En pacientes con el fenotipo severo, la esperanza de vida se centra entre la segunda y tercera década de vida, mientras que hay pacientes con fenotipo atenuado que han superado los 70 años de edad (Montaño et al., 2007).

4.1. Prevalencia de la MPS IVA

La prevalencia de la MPS IVA varía mucho en función del área geográfica estudiada, creando un rango desde 1 paciente por cada 70.922 nacimientos vivos en los Emiratos Árabes Unidos (Al-Jasmi et al., 2013) a 1 paciente por cada 641.178 nacimientos vivos en el oeste de Australia (Nelson et al., 2003) (Tabla 5).

Tabla 5. Prevalencias de la MPS IVA

País de Estudio	Período de estudio	Prevalencia por 10.000 nacimientos vivos	Referencia bibliográfica
Alemania	1980-1995	0,038	Baehner, 2005
Australia (oeste)	1969-1996	0,0156	Nelson, 2003
Brasil	2004-2013	0,009	Giugliani, 2014
Canadá	1972-1996	0,048	Applegarth, 2000
Emiratos Árabes Unidos	1995-2010	0,14	Al-Jasmi, 2013
Japón	1991-2011	0,02	Akiyama, 2014
Países Bajos	1970-1996	0,022	Poorthuis, 1999
Reino Unido	1958-1985	0,13	Nelson, 1997
Taiwán	1984-2004	0,033	Lin, 2009

Recopilatorio de prevalencias de la MPS IVA en la literatura científico-médica.

La estimación correcta de la prevalencia de la MPS IVA, al igual que de otras enfermedades minoritarias, es difícil debido a la gran variabilidad clínica de los pacientes y a la presencia de formas atenuadas de aparición adulta. Estas dificultades hacen que, en muchos casos, estos pacientes puedan llegar a estar mal diagnosticados, dando lugar así a una subestimación de la frecuencia de esta enfermedad. Según el portal *Orpha.net*, la MPS IVA presenta una prevalencia de 1/250.000 a nivel de la Unión Europea.

4.2. N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS)

4.2.1. Gen codificante para la proteína GALNS humana

El *locus* del gen *GALNS* humano, aislado por primera vez en el año 1991 por el Dr. S. Tomatsu (Tomatsu et al., 1991), se encuentra en el cromosoma 16q24.3 y comprende una región aproximada de 50 kb con 13 intrones y 14 exones. Este gen da lugar a un transcrito de RNA mensajero (mRNA) de 1566 pb que se traduce en un péptido de 522 aminoácidos (aa), el cual incluye un péptido señal de 26 aa (Fukuda et al., 1992) (Figura 4). Esta sulfatasa está altamente conservada en especies como el ratón (*Mus musculus*), el perro (*Canis lupus familiaris*) y la rata (*Rattus norvegicus*). Todas ellas presentan un porcentaje de homología de la secuencia codificante superior al 80%, respecto a la secuencia codificante humana (*Homo sapiens*).

Mediante análisis de mRNA se ha determinado la expresión del gen *GALNS* humano en distintos órganos (Figura 5). Se ha observado un mayor nivel de expresión principalmente en células T, células mieloides y monocitos.

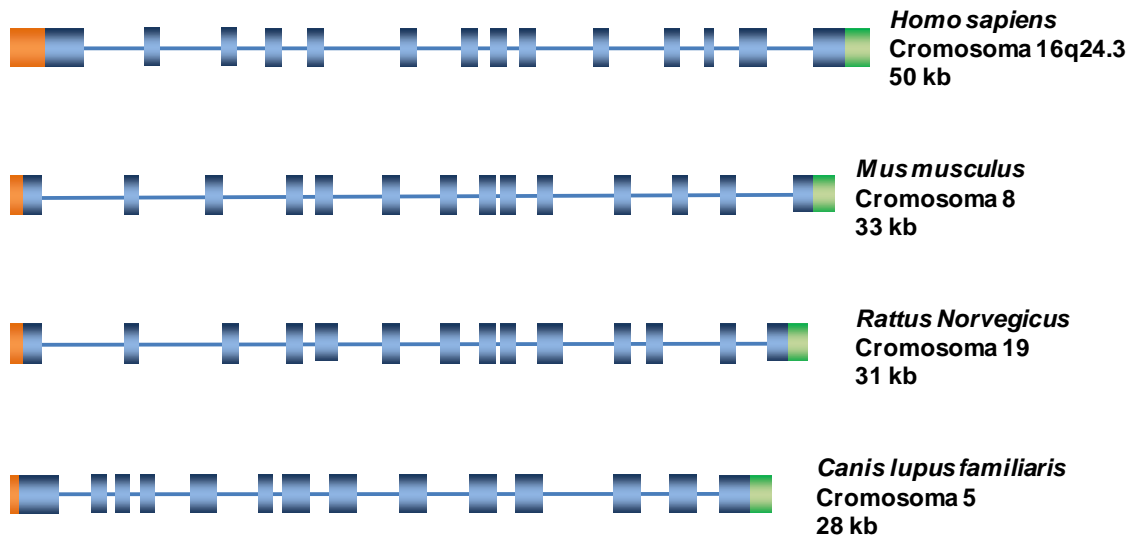


Figura 4. Representación esquemática de los genes codificantes para la proteína GALNS humana, murinas y canina. Organización, localización cromosómica y medida de los genes codificantes para la N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa humana, murinas y canina. Las cajas naranjas y verdes indican las regiones no traducidas en 5' y 3', respectivamente. Las cajas azules indican los exones. La línea azul más delgada indica los intrones. Figura no hecha a escala.

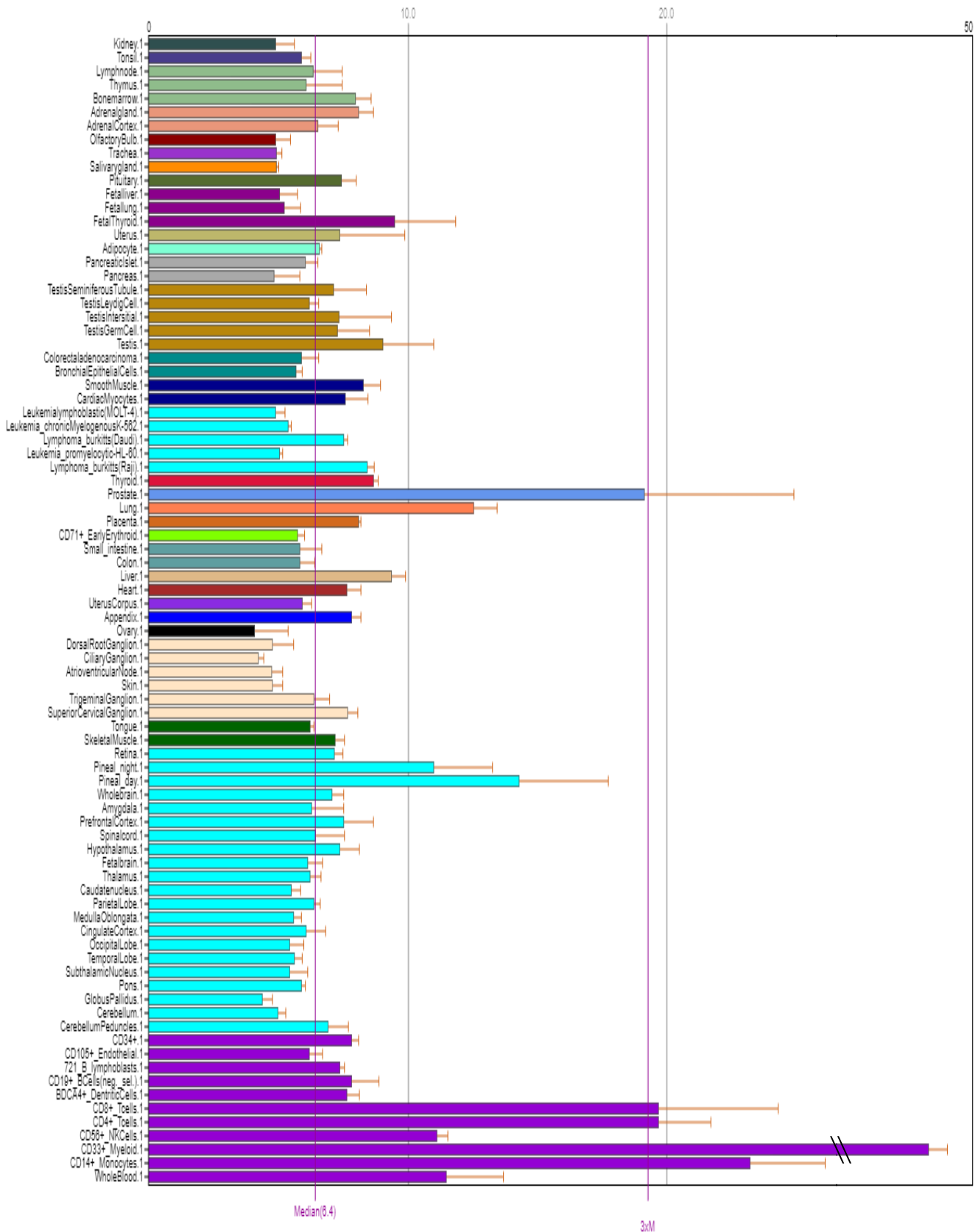


Figura 5. Expresión del gen GALNS humano en diferentes tejidos. Los valores del eje superior hacen referencia a Unidades Arbitrarias de expresión. Extraído de <http://biogps.org/#goto=genereport&id=2588>.

4.2.2. Enzima GALNS

La enzima GALNS es una sulfatasa que actúa hidrolizando el grupo éster del sulfato del extremo no reducido de la N-acetilgalactosamina 6-sulfato en el caso del C6S y del grupo éster de sulfato del extremo no reducido de la galactosa 6-sulfato en el caso del QS (Figura 6) (Fukuda et al., 1992).

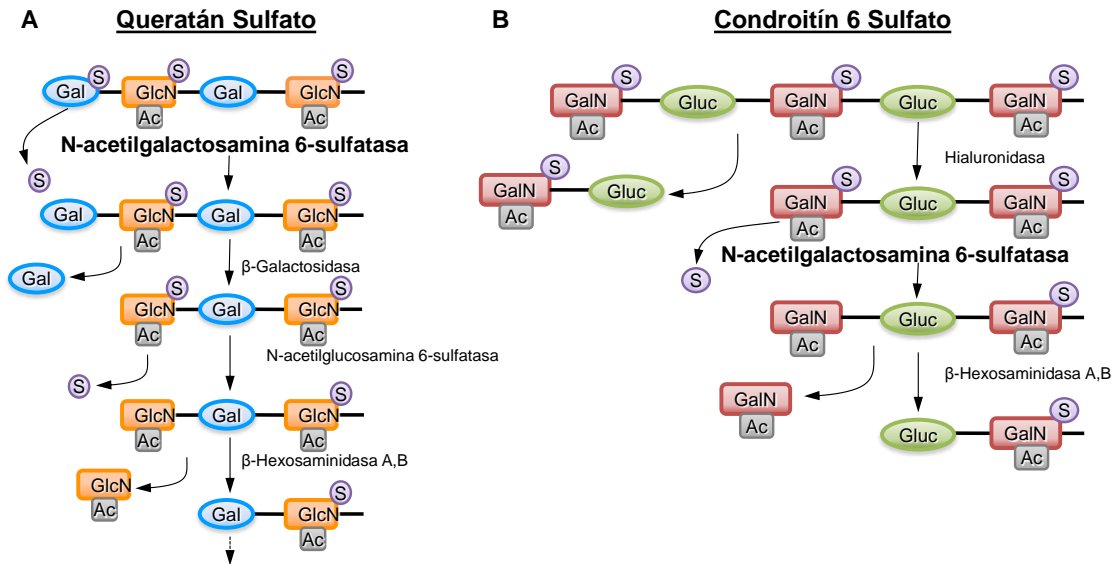


Figura 6. Degradación del (A) Queratán sulfato y (B) Condroitín sulfato. La degradación de estos GAGs es un proceso multienzimático. Adaptado de (Neufeld and Muenzer, 2001).

La enzima GALNS no fue purificada hasta 1979, aislada de placenta humana (Glossl et al., 1979). En 2012 se cristalizó la proteína recombinante producida en células de mosquito (Rivera-Colón et al., 2012). El análisis cristalográfico de la proteína recombinante reveló que GALNS se organiza en homodímeros. Cada monómero presenta un primer dominio con el centro activo en su extremo N-terminal (Dominio 1, residuos 28-379), un segundo dominio con una hoja β antiparalela (Dominio 2, residuos 380-481) y un tercer dominio en el extremo C-terminal (Dominio 3, residuos 482-510) que penetra en el dominio 1 y acaba de formar el centro activo de la proteína. Dicho centro activo presenta una región de unión a Ca^{2+} (Figura 7).

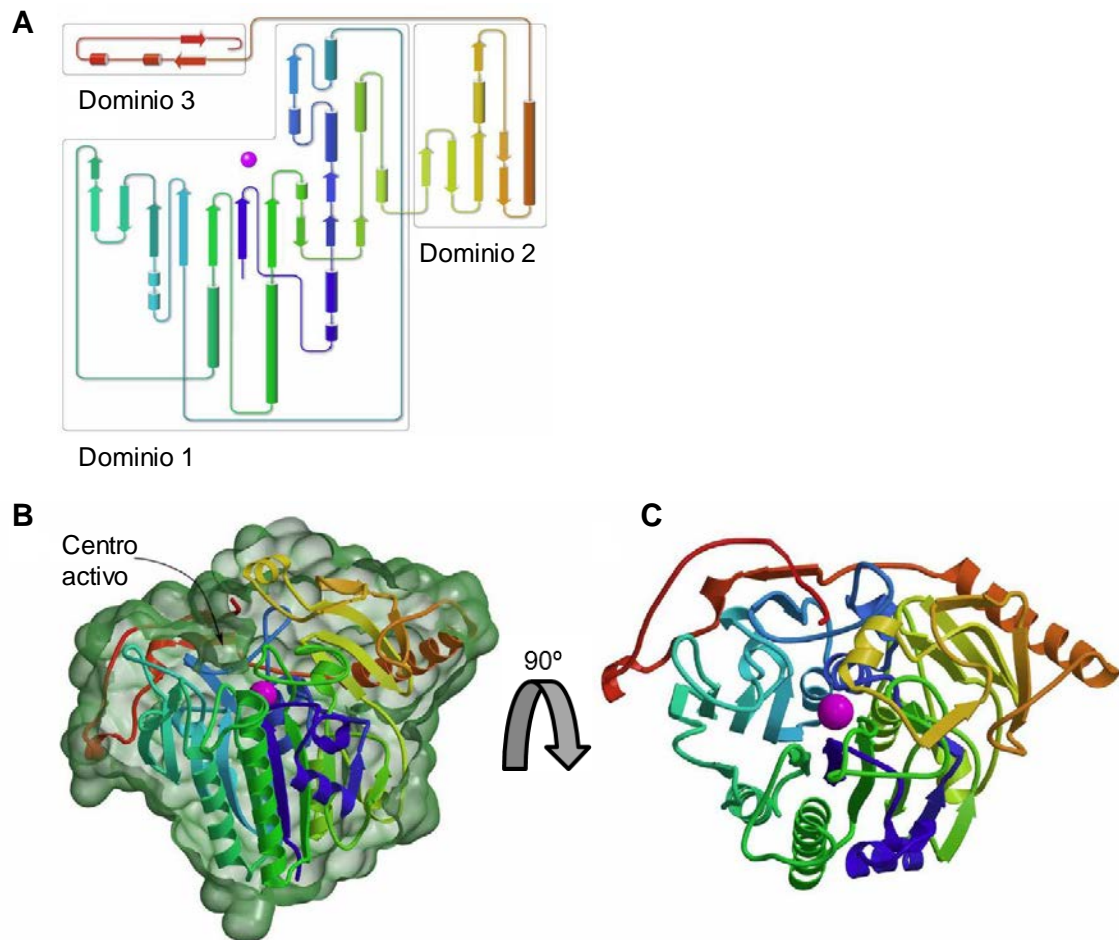


Figura 7. Estructura proteica de la enzima N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa humana. (A) Representación esquemática de los distintos dominios del monómero de la proteína GALNS (Ca^{2+} representado en color lila). (B) Distribución espacial de los distintos dominios del monómero de GALNS. (C) Vista ortogonal del monómero de GALNS. Adaptado de (Rivera-Colón et al., 2012).

El análisis de la proteína reveló que cada monómero presenta 2 lugares potenciales de glicosilación en residuos de Asparagina (Asn 204 y Asn 423), 3 puentes disulfuro entre Cisteínas (Cys 308-419, Cys 489-518 y Cys 501-507) y una séptima Cys 79 que no forma puente disulfuro. Esta Cys79 juega un papel clave en el centro activo de GALNS y está altamente conservada en muchas sulfatasas de otras especies. Durante las modificaciones post-traduccionales, este residuo se modifica a formilglicina por actuación de la enzima SUMF1 (Sulfatase Modifying Factor 1) (Cosma et al., 2003).

El peso molecular de GALNS es de 60 kDa en su forma precursora, la cual se transporta al lisosoma usando los M6PR donde acabará de madurar y dará lugar a 2 subunidades, una de 15 kDa y otra de 40 kDa (Moldave, 2001). La forma madura de GALNS humana es estabilizada en un complejo con otras 2 enzimas lisosomales: β -Galactosidasa y α -Neuraminidasa, y con una tercera enzima llamada Catepsina A. Este

complejo recibe el nombre de Complejo Multienzimático Lisosomal y es necesario para el correcto catabolismo del queratán sulfato (Pshezhetsky and Potier, 1996).

La sulfatasa GALNS está altamente conservada en especies como el ratón (*Mus musculus*), el perro (*Canis lupus familiaris*) y la rata (*Rattus norvegicus*) con las que comparte un 85-87% de homología a nivel de secuencia de aminoácidos respecto a la GALNS humana.

4.2.3. Mutaciones en el gen GALNS humano

Actualmente, se han descrito más de 200 mutaciones distintas en el gen *GALNS*, entre las cuales se encuentran mutaciones de diferentes tipos: inserciones/deleciones, mutaciones sin sentido (*nonsense*), mutaciones en región de *splicing* o mutaciones con cambio de sentido (*missense*). El 69% de las mutaciones son del tipo *missense*, entre las que se encuentran 9 de las 10 mutaciones más frecuentes de la enfermedad (Hendriksz et al., 2013a). Esta gran variedad de mutaciones puede afectar a diferentes regiones de la proteína y pueden dar lugar a diferentes alteraciones que resultan en fenotipos muy diversos (Figura 8).

La mutación *missense* más frecuente en humanos consiste en el cambio de una Citosina en posición 1156 por una Timina (c.1156C>T), cambio que da lugar a la sustitución de una Arginina en posición 386 por una Cisteína (p.Arg386Cys) en la enzima (Fukuda et al., 1996). Esta mutación provoca una forma severa de la enfermedad (Tomatsu et al., 2005a) (Tabla 6).

De las diez mutaciones más frecuentes, en 2014 en España se habían descrito 9 casos con la mutación *missense* p.Arg386Cys, 5 casos con la mutación *missense* p.Gly301Cys y 2 casos con la mutación *missense* p.Ser287Leu (Morrone et al., 2014; Pajares et al., 2012).

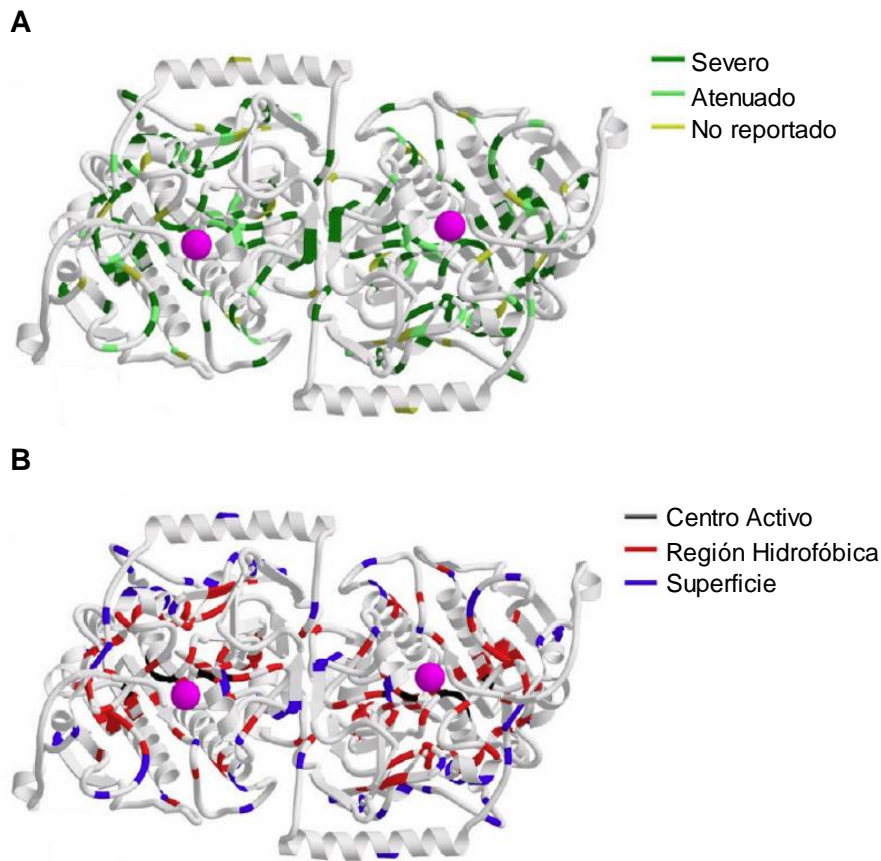


Figura 8. Zonas de mutación en la enzima GALNS. (A) Las mutaciones se representan en diferentes colores en función del fenotipo que causan: Severo (estatura inferior a 120 cm), Atenuado (superior a 140 cm) o No reportado. **(B)** Las mutaciones se representan en diferentes colores en función de la región de la proteína que ocupan: Centro activo, Región hidrofóbica o Superficie. Adaptado de (Rivera-Colón et al., 2012).

Tabla 6. Las diez mutaciones más frecuentes de la enzima GALNS reportadas en pacientes de Morquio A

Cambio de Nucleótido	Cambio de aminoácido	Tipo de mutación	Número de casos reportados	Fenotipo
c.1156C>T	p.Arg386Cys	Missense	55	Severo
c.337A>T	p.Ile113Phe	Missense	52	Severo
c.901G>T	p.Gly301Cys	Missense	45	Severo
c.120+1G>A	-	Mutación en región de splicing	22	No reportado
c.935C>G	p.Thr312Ser	Missense	22	Atenuado
c.1171A>G	p.Met391Val	Missense	22	Atenuado
c.871G>A	p.Ala291Thr	Missense	20	Severo
c.860C>T	p.Ser287Leu	Missense	20	Severo
c.953T>A	p.Met318Arg	Missense	19	Severo
c.757C>T	p.Arg253Trp	Missense	18	Atenuado

Adaptado de (Morrone et al., 2014; Tomatsu et al., 2005a).

4.3. Correlación genotipo-fenotipo

El elevado grado de heterogeneidad molecular descrito en las mutaciones anteriores, refleja la amplia variabilidad clínica observada en pacientes de la MPS IVA.

Para la enfermedad de Morquio A se han realizado varios estudios correlacionando la severidad del fenotipo con mutaciones concretas. En 2013, se realizó un estudio de correlación genotipo-fenotipo en el que se analizaron 185 mutaciones distintas englobando *missense*, inserciones/delecciones, *nonsense* y mutaciones en regiones de splicing. En este estudio se determinó que en el caso de las mutaciones *missense*, la correlación genotipo y fenotipo estaba directamente ligada al grado de conservación evolutiva del residuo mutado con una sensibilidad del 80-85% y una especificidad del 70-90% (Düng et al., 2013).

En un segundo estudio llevado a cabo durante el 2014 se realizaron diversos análisis bioinformáticos en los que se volvió a correlacionar un fenotipo más severo con aquellas mutaciones *missense* que afectaban a residuos altamente conservados en la enzima GALNS con respecto a otras sulfatasas, tanto humanas como de diferentes especies (Olarde-Avellaneda et al., 2014).

A pesar de los estudios anteriores, actualmente aún es muy difícil establecer una correlación entre genotipo y fenotipo, ya que ésta depende de diversos factores como la clasificación subjetiva de los pacientes, tanto clínica como bioquímicamente; la asociación de GALNS con el complejo multienzimático lisosomal o incluso de factores epigenéticos (Olarde-Avellaneda et al., 2014).

4.4. Acción biológica del Queratán Sulfato

El papel principal del QS en los tejidos es el de mantenerlos hidratados. Esta hidratación permite al QS actuar de amortiguador en las articulaciones y mantener la transparencia en la córnea (Bettelheim and Plessy, 1975).

El QS se encuentra principalmente en el cartílago, donde representa un 25% del total de GAGs (Düng et al., 2013). En la córnea, representa un 65% del total de GAGs (Gipson et al., 2004). Además, es uno de los componentes más importantes del hueso y es el GAG más abundante de la matriz extracelular (MEC) de las válvulas cardiacas (Latif et al., 2005). También se encuentra distribuido por todo el tracto genital femenino, pulmones, glándulas mamarias y tiroides. Sin embargo, no está presente en el sistema digestivo ni en el tracto urinario (Miyamoto et al., 2011). Además, se determinó en rata

que el QS jugaba un papel muy importante en el desarrollo axonal de las neuronas a nivel del tálamo y el córtex (Miller et al., 1997).

El principal proteoglicano al que se une el QS es el Agreca, el principal mucopolisacárido del cartílago, aunque también se une al Lumicán. Una vez unido a éste, el QS participa en muchas otras funciones celulares como por ejemplo en la migración celular (Saika et al., 2003).

4.5. Acción biológica del Condroitín 6-Sulfato

Al igual que el QS, el CS se une al proteoglicano Agreca en el cartílago articular. En función de la edad y la región del cartílago articular podemos encontrar diferentes patrones de sulfatación: (i) no sulfatado, (ii) 4-sulfato (C4S) o (iii) 6-sulfato (C6S) (Bayliss et al., 1999). El C4S y el C6S también se encuentran en el líquido sinovial (Heimer et al., 1992). Además, el C6S se encuentra principalmente en el cartílago, tejido conectivo, piel, ligamentos, tejido neural, ojo y vasos sanguíneos y células sanguíneas.

En el cartílago articular, el C6S unido al Agreca permite la hidratación del tejido, propiedad que ayuda a las articulaciones a soportar fuerzas compresivas y permite un movimiento libre de dolor en las articulaciones (Bathe et al., 2005). En la piel, el principal proteoglicano de unión a C6S es la Decorina, que tiene un papel esencial en la flexibilidad mecánica de este tejido (Li et al., 2013) y participa en la proliferación celular (Moscatello et al., 1998). En los condrocitos y células sinoviales, el C6S participa en la disminución de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (Jomphe et al., 2008; Tan and Tabata, 2014).

4.6. Fisiopatología de la MPS IVA

Durante el crecimiento los huesos largos crecen mediante un proceso conocido como osificación endocondral, que consiste en la sustitución del cartílago de las placas de crecimiento, presentes en los extremos de los huesos largos, por hueso nuevo.

En los pacientes de Morquio A se observa acumulación de QS y C6S no degradado en múltiples tejidos (Doherty et al., 2018; Yasuda et al., 2013), llevando a una característica displasia esquelética, causada por la acumulación de estos GAGs en los condrocitos de las placas de crecimiento y la MEC que los rodea. Esta acumulación provoca una condrogénesis anormal y, en consecuencia, una osificación endocondral

anormal (Byers et al., 2018; Tomatsu et al., 2014). Se han desarrollado varias técnicas para la detección de estos GAGs en orina y suero, aunque la que proporciona resultados más precisos, y por lo tanto más fiables, es la espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS) (Shimada et al., 2014, 2015).

Los niveles de QS están muy relacionados con el fenotipo óseo. Esta correlación únicamente se observa en pacientes entre 5 y 15 años de edad, observándose una mayor presencia de QS en sangre y orina en aquellos pacientes con un fenotipo más severo y una menor presencia de QS en pacientes con un fenotipo más atenuado. Esta correlación se pierde entre los 15 y 20 años de edad, debido a que los pacientes superan la edad de crecimiento. La pérdida de cartílago en las placas de crecimiento durante el crecimiento provoca, tanto en humanos sanos como en pacientes con MPS IVA, una marcada reducción de la síntesis de QS en este tejido y, por lo tanto, en los niveles de este GAG en la sangre. En cuanto a los niveles de QS en orina, se hipotetiza que no proceden del cartílago, sino más bien de acúmulos de este GAG en el riñón o del filtrado de la sangre, por lo que resultan en moléculas mucho más pequeñas que las presentes en la sangre. A diferencia de la sangre, en la orina la contribución del QS al contenido total de GAGs es muy baja, por este motivo, la medida de GAGs totales en orina puede llevar al mal diagnóstico de pacientes con MPS IVA (Düng et al., 2013).

4.7. Sintomatología de la MPS IVA

4.7.1. Síntomas iniciales

Los signos y síntomas clínicos iniciales pueden diferir según la severidad con la que se presente la enfermedad. La mayoría de pacientes con MPS IVA nacen asintomáticos y empiezan a desarrollar anomalías esqueléticas entre el primer y tercer año de vida (Montaño et al., 2007). En los pacientes con fenotipos más atenuados, la aparición de estos primeros signos y síntomas clínicos puede retrasarse hasta la adolescencia. Según datos del registro internacional de Morquio A, menos del 50% de pacientes son diagnosticados antes de los 5 años.

4.7.2. Anomalías esqueléticas

Los síntomas clínicos más evidentes en los pacientes con MPS IVA son las anomalías esqueléticas, entre las que se encuentran: *genu valgum*, comúnmente

llamado “pata de catre”, y que consiste en una alteración postural de los miembros inferiores que se traduce en una desviación de las rodillas hacia abajo, provocando que las rodillas de ambas extremidades se junten y los tobillos se separen; cifosis, consistente en una curvatura anormal de la columna vertebral de convexidad posterior; *pectus carinatum* o pecho en campana, que consiste en una deformidad de la caja torácica en la que el pecho protruye en quilla de barco; laxidad de las articulaciones; corta estatura; trastornos de la marcha y complicaciones espinales derivadas de la compresión cervical e hipoplasia odontoide. La apófisis odontoide, un hueso localizado entre la primera y segunda vértebra, se encarga de estabilizar los movimientos de la cabeza hacia adelante y atrás. En los pacientes de Morquio A este hueso puede faltar o ser muy pequeño (hipoplasia) por lo cual la médula espinal está insuficientemente protegida (Harmatz et al., 2014; Leone et al., 2015; Montaña et al., 2007).

Físicamente estos pacientes presentan un tamaño craneal desproporcionado con el resto del cuerpo y unos rasgos faciales toscos. La boca tiende a ser más grande, la quijada es cuadrada y el puente de la nariz es plano, dando lugar a una nariz pequeña. La frente es prominente y el cuello muy corto. Los dientes están ampliamente espaciados y el esmalte que los recubre es, frecuentemente, muy delgado. La dentina es, a su vez, también muy delgada y de color gris amarillento (James et al., 2012). Con frecuencia los hombros están dislocados parcialmente hacia abajo (sub-luxados), por lo tanto, los brazos no se pueden poner rectos sobre la cabeza.

4.7.3. Anomalías no esqueléticas

Los principales signos no esqueléticos que ayudan al diagnóstico de un paciente con MPS IVA son: fallos respiratorios, complicaciones cardíacas, opacidad corneal, y problemas auditivos.

Los problemas en las vías respiratorias ponen en un grave compromiso la vida de los pacientes y son una de las principales causas de muerte (Theroux et al., 2012). Entre los problemas en las vías respiratorias cabe destacar la obstrucción de la tráquea, que se produce debido a una combinación de: (i) desarrollo desproporcionado de la tráquea, de la arteria braquiocefálica, del cuello y de la cavidad pectoral; (ii) acumulación de GAGs en las vías respiratorias; y (iii) un severo *pectus carinatum* (Doherty et al., 2018; Pizarro et al., 2016; Tomatsu et al., 2016). Estas anomalías en la tráquea, sumado a las posibles fusiones cervicales, dificultan la intubación de estos pacientes en intervenciones quirúrgicas (Theroux et al., 2012). A nivel pulmonar, se ha observado

que este tipo de pacientes presentan un aumento del volumen pulmonar, lo que lleva a una disminución de la resistencia respiratoria (Kubaski et al., 2015). En estos pacientes también son muy comunes los episodios de apnea durante el sueño, las infecciones respiratorias y los ronquidos.

Otra de las graves complicaciones que ponen en compromiso la vida de los pacientes son las anomalías a nivel cardíaco y del sistema cardiovascular, las cuales son otra de las principales causas de muerte. En los pacientes con Morquio A, el corazón se caracteriza por un reducido tamaño del ventrículo izquierdo y un mayor engrosamiento de sus paredes, lo cual reduce el volumen sistólico y, por lo tanto, aumenta el ritmo cardíaco. Además, suelen presentar un engrosamiento de las válvulas mitral y aórtica que, en la mayoría de casos, agravan la patología cardíaca y cardiovascular (Kampmann et al., 2016).

La opacidad corneal es otra de las características más comunes en esta enfermedad, aunque es menos severa y presenta una progresión más lenta que en otras MPSs (Danes, 1973). Esta opacidad es debida a un mal funcionamiento de los queratinocitos debido al depósito de GAGs en su interior, y a un mayor acúmulo de material extracelular en la superficie de la córnea. Los pacientes de Morquio A tienden a tener astigmatismo, además de miopía e hipermetropía (Hendriksz et al., 2013b).

Al igual que en el resto de MPSs, los pacientes con Morquio A presentan una reducción de la capacidad auditiva que puede ser atribuida a múltiples causas. La causa más común es debida a infecciones respiratorias, aunque ésta pérdida conductiva de la audición también puede ser debida a deformidades en los osículos auditivos (Barranger and Cabrera-Salazar, 2007). En cuanto a la pérdida sensorineuronal, ésta puede ser causada por acumulación de GAGs en el nervio auditivo. La mayoría de pacientes presentan una mezcla de pérdida conductiva y sensorineuronal. Esta pérdida también es progresiva (Hendriksz et al., 2013b).

El sistema digestivo también está alterado en estos pacientes. Esta alteración aparece en forma de hernias, siendo las más comunes la umbilical e inguinal (Ashworth et al., 2006). Otro de los órganos del sistema digestivo que suele estar afectado es el hígado. En este órgano la afectación se presenta en forma de hepatomegalia debido al depósito de QS y C6S (Minami et al., 1979; Nelson et al., 1988).

4.7.4. Muerte

Los pacientes con un fenotipo más severo suelen morir entre la segunda y tercera década de vida, principalmente debido a la inestabilidad cervical y a las complicaciones respiratorias. No obstante, se han observado supervivencias más elevadas en pacientes con fenotipos más atenuados, habiéndose descrito pacientes mayores de 70 años. (Montaño et al., 2007).

4.8. Diagnóstico de la MPS IVA

4.8.1. Diagnóstico convencional

Las primeras pruebas diagnósticas que se pueden realizar a un paciente cuando hay sospecha de alguna MPS son análisis de actividades enzimáticas lisosomales en una gota de sangre coagulada (*DBS: Dried Blood Spot*) o la cuantificación de GAGs presentes en orina o suero siendo, normalmente ésta última, la prueba de elección. Hay muchas metodologías para determinar la presencia de GAGs en estos fluidos, como el uso de azul de dimetilmetileno (*DMB: Dimetilenblue*) (Whitley et al., 1989). El problema de esta técnica es la posibilidad de falsos positivos por interacción del DMB con la hemoglobina del suero o de falsos negativos debido a la formación de agregados del colágeno, albúmina y glicoproteínas. Además, esta cuantificación no permite identificar el tipo de GAG que se detecta. Otra metodología de detección de GAGs en suero u orina es el uso de ELISAs con anticuerpos monoclonales específicos para cada GAG. Sin embargo, actualmente la metodología que se presenta como más prometedora es el uso de la técnica de LC-MS/MS, la cual presenta una sensibilidad mucho mayor que los ELISAs (Hintze et al., 2011; Tomatsu et al., 2010a). En el caso de los pacientes con Morquio A, el GAG mayoritario que aparece en orina y suero es el QS (Wolfe et al., 2011). Una vez determinada la queratán sulfatúria, se analiza la actividad de la enzima GALNS en leucocitos o fibroblastos, con la finalidad de obtener el diagnóstico definitivo (Figura 9). Para la detección de la actividad enzimática se utiliza un sustrato sintético conjugado con el fluoróforo 4-Metilumbeliferona (4-MU) (van Diggelen et al., 1990), aunque también se puede realizar la cuantificación directa de la enzima GALNS o de otras enzimas lisosomales mediante el uso de LC-MS/MS (Mashima et al., 2018).

Una vez se tiene la confirmación de MPS IVA se puede iniciar el tratamiento y el estudio molecular del paciente para determinar la mutación que provoca la enfermedad.

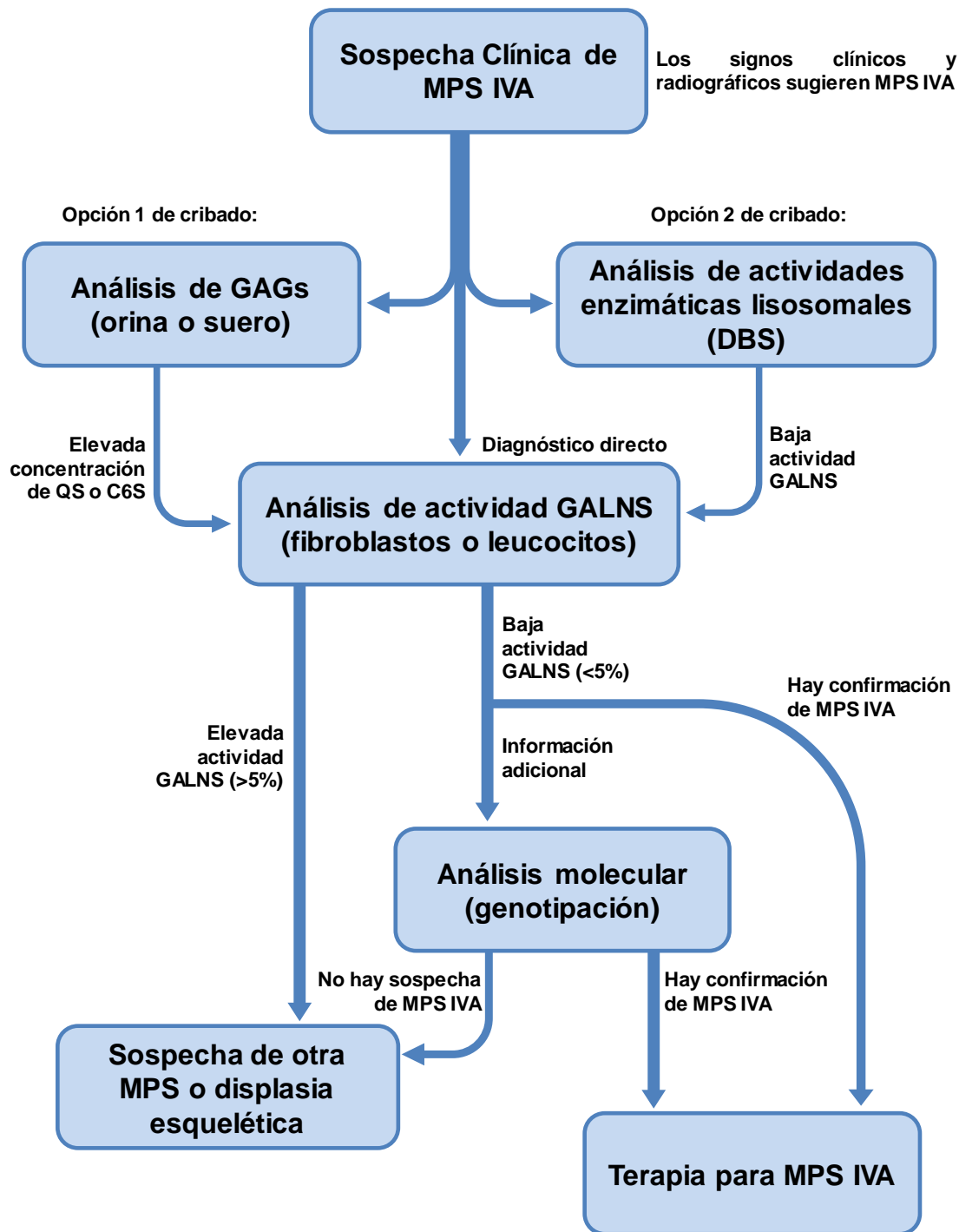


Figura 9. Algoritmo para el diagnóstico de la MPS IVA.

4.8.2. Diagnóstico postnatal

Debido a la necesidad de diagnosticar a los pacientes antes de que se establezca una acumulación patológica de GAGs causando efectos irreversibles, actualmente se está investigando el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico para la detección de todas las MPS en niños recién nacidos. Inicialmente, estos test intentaban identificar una mayor cantidad de proteína LAMP1, indicativo de abundancia y distensión lisosomal, aunque se observó que en estos test los pacientes de Morquio A no presentaban una mayor concentración de LAMP1 respecto a los valores de pacientes sanos (Meikle, 2004). Actualmente, los NBS que están bajo estudio se basan en la inmunocuantificación de determinados enzimas lisosomales (Chuang et al., 2017; Matern et al., 2015) o en el uso de la espectrometría de masas para la detección de los productos derivados de la reacción enzimática de GALNS mediante el estudio de su actividad enzimática en gota de sangre coagulada (Khaliq et al., 2011; Smith et al., 2018).

4.8.3. Diagnóstico prenatal

El diagnóstico prenatal se puede realizar en embarazos de familias que ya tienen un hijo diagnosticado con MPS IVA o algún antecedente familiar. Hay tres formas de realizar el diagnóstico prenatal:

- (a) *Biopsia de vellosidades coriónicas*: Se suele llevar a cabo entre las semanas 11-12. Si se conoce la mutación causal, directamente se puede obtener DNA de las vellosidades y hacer un análisis para detectar la mutación. Si, por el contrario, se desconoce la mutación causal de la enfermedad, se puede realizar un estudio de actividad enzimática GALNS, para el cual se debe realizar un cultivo celular previo de las vellosidades (Kleijer et al., 2000; Zhao et al., 1990).

- (b) *Amniocentesis*: El conocimiento de la mutación causal permite realizar el diagnóstico prenatal a partir de DNA extraído de amniocitos cultivados. Si se desconoce la mutación, se puede realizar el análisis de la actividad enzimática también en amniocitos cultivados. Además, el líquido amniótico permite la determinación de GAGs como prueba complementaria al diagnóstico (Mossman and Patrick, 1982).

- (c) *Diagnóstico preimplantacional de embriones*. Se suele llevar a cabo entre los días 3 y 6 del desarrollo embrionario, extrayendo el DNA de una o varias células que conforman el embrión. Sólo puede llevarse a cabo si se conoce la mutación o mutaciones específicas de la familia afectada (Qubbaj et al., 2008).

4.9. Modelos animales de MPS IVA

Para el estudio de las bases genéticas y metabólicas de una determinada enfermedad y para el ensayo de posibles terapias, es necesario el uso de modelos animales. Para el síndrome de Morquio A, actualmente, se han descritos 3 modelos murinos: (i) un ratón *Knock-out* (KO), (ii) un ratón *Knock-in* (KI) humanizado y (iii) un ratón KI (Tabla 7) (Tomatsu et al., 2003, 2005b, 2007a).

El primer modelo en generarse fue un modelo de ratón KO, que presenta una disrupción en el exón 2 del gen *Galns*. Este modelo no presenta niveles detectables de actividad GALNS en múltiples tejidos y tiene elevadas concentraciones de QS en orina. Además, presenta depósitos de GAGs en varios órganos como el hígado, riñón bazo, cerebro y médula ósea. A los 2 meses de edad los depósitos de GAGs del hígado y del bazo se encuentran, específicamente, en las células de *Kupffer* y en las células del revestimiento sinusoidal, respectivamente. A los 12 meses empiezan a aparecer vacuolas de depósito en células epiteliales de los glomérulos y en las válvulas cardíacas. En este ratón modelo se ha observado acúmulo de GAGs en determinadas regiones del cerebro, como las meninges, el hipocampo y las neuronas neocorticales. También presenta exceso de acumulación de QS y C6S en el citoplasma de las células epiteliales de la córnea. Sin embargo, este ratón KO, a la edad de 12 meses no presenta ningún signo radiográfico de displasia esquelética (Tomatsu et al., 2003).

El segundo modelo en generarse fue un modelo de ratón KI humanizado. En este caso, el modelo animal presentaba una mutación específica que provocaba el cambio de una Cisteína en posición 76 por una Serina. Esta Cys 76 en el ratón corresponde a la Cys 79 de la proteína GALNS humana y, como se mencionó anteriormente, es un aa altamente conservado, clave en el centro activo de la proteína. Además, en este modelo se introdujo, mediante mutagénesis dirigida, una copia del cDNA del gen *GALNS* humano con la mutación C79S en el intrón 1 del gen *Galns* murino. De esta manera se generó un modelo animal tolerante a la proteína GALNS humana previniendo, así, la posible reacción inmune durante los ensayos clínicos de las terapias de reemplazo enzimático, ya que en muchos casos se ha observado que la respuesta humoral contra

la proteína recombinante puede alterar el efecto terapéutico de ésta (Kakkis et al., 1996, 2001). Este ratón modelo no presenta niveles detectables de actividad GALNS en múltiples tejidos y muestra depósitos de GAGs en varios tejidos como órganos viscerales, hueso, cartílago, córnea, cerebro y médula ósea. A los 3 meses de edad, no sólo se observan depósitos de GAGs en las células de recubrimiento sinusoidal en el bazo y en las células de *Kupffer* en el hígado, sino que también se observan acúmulos en los hepatocitos. Además, se observa una marcada distensión lisosomal e incrementada vacuolización de los osteoblastos, osteocitos y condrocitos y una clara desorganización de la placa de crecimiento del hueso. Estudios radiográficos y de microtomografía computarizada (micro-CT) determinaron que no había diferencias en estructura ni densidad ósea entre el modelo de ratón KI humanizado y los controles sanos. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de QS en suero entre el modelo KI tolerante y su control sano (Tomatsu et al., 2005b). Sin embargo, en estudios de purificación del fondo genético de este modelo hacia el fondo genético C57BL/6J se observó una ligera desviación del calcáneo en los animales KI humanizados (Rowan et al., 2013).

El tercer modelo en generarse fue un modelo de ratón KI que, al igual que el KI humanizado, presentaba la mutación C76S. Este modelo presentaba un fenotipo muy similar al KI humanizado, aunque en este caso era algo más atenuado. Una de las posibles explicaciones sería que en este nuevo modelo la actividad de otras sulfatasas diferentes a GALNS no estaban reducidas respecto a los controles sanos, cosa que sí se observó en el ratón KI humanizado (Tomatsu et al., 2007a).

A pesar de que los 3 modelos murinos de MPS IVA presentan acúmulos lisosomales en diferentes órganos, ninguno de ellos presenta la marcada patología ósea característica de los pacientes humanos. Esta falta de fenotipo óseo, se considera que puede ser debida a las diferencias en la síntesis de QS en el hueso entre humanos y ratones (Tomatsu et al., 2007a; Venn and Mason, 1985) y al hecho de que en el ratón el condroitín sulfato mayoritario en el cartílago de la placa de crecimiento es el C4S en vez del C6S, al contrario de lo que se observa en el cartílago de crecimiento en humanos (Gaffen et al., 1995; Rowan et al., 2013).

Tabla 7. Comparación de los modelos animales murinos para el síndrome de Morquio A

Modelo Animal	Modificación genética	Esperanza de vida	GAGs	Histología	Actividad GALNS	Actividades secundarias	Alteraciones esqueléticas	Referencia
			Orina			Ligero incremento en la actividad de:		
			Galns ^{-/-} 387±275 mg GAG/g Cre			β-galactosidasa, α-galactosidasa,		
			Galns ^{+/-} 142±142 mg GAG/g Cre	A 2, 7 y 12 meses se observa vacuolización en hígado, bazo, riñón, válvulas del corazón, médula ósea, cerebro y córnea.	Los ratones MPS IVA no muestran actividad en los siguientes tejidos: hígado, riñón, cerebro, bazo, pulmón, corazón, músculo, hueso, médula ósea y suero. No incremento de α-manosidasa	No hay anomalías esqueléticas durante los 12 primeros meses	Tomatsu., et al 2003	
Ratón C57BL/6J-129/Sv	KO Disrupción en el exón 2	No hay diferencias de supervivencia en los primeros 12 meses	Córnea Galns ^{-/-} 2,94 mg GAG/g Galns ^{+/-} 1,23 mg GAG/g					
			Orina			Reducción en la actividad de:	No hay anomalías esqueléticas durante los 12 primeros meses.	Tomatsu., et al 2005b
			Galns ^{-/-} 540±174 mg GAG/g Cre	A 4 meses se observa vacuolización en hígado, válvula del corazón, meninges, hipocampo, riñón, bazo, placa de crecimiento, hueso y córnea (acúmulo extracelular).	Los ratones MPS IVA no muestran actividad en los siguientes tejidos: hígado, riñón, cerebro, bazo, pulmón, corazón, músculo, hueso, médula ósea y suero.	Iduronato 2-sulfatasa, Ari sulfatasa, Sulfaminidasa.	Tomatsu., et al 2007	
Ratón C57BL/6J-129/Sv	KI humanizado hC79S + mC76S	No hay diferencias de supervivencia en los primeros 12 meses	Galns ^{+/-} 417±159 mg GAG/g Cre				Purificando a fondo genético C57BL/6J se observan alteraciones en el calcáneo	Rowan., et al 2013
			Orina			Ligero incremento en la actividad de:		
			No hay incremento de GAGs entre Galns ^{-/-} y Galns ^{+/-}	Se observa vacuolización en hígado, bazo, válvula del corazón, riñón, meninges, hipocampo y placa de crecimiento.	Los ratones MPS IVA no muestran actividad en los siguientes tejidos: hígado, riñón, cerebro, bazo, corazón, hueso, médula ósea y suero.	Iduronato 2-sulfatasa, Ari sulfatasa, Sulfaminidasa.	No hay anomalías esqueléticas durante los 12 primeros meses.	Tomatsu., et al 2007
Ratón C57BL/6J-129/Sv	KI mC76S	No hay diferencias de supervivencia en los primeros 12 meses						

4.10. Terapias para Morquio A

Para el correcto tratamiento de los pacientes con MPS IVA son necesarias evaluaciones periódicas, curas de soporte y un equipo clínico multidisciplinar que pueda abordar la gran variedad de complicaciones, sobre todo a nivel cervical, respiratorio y cardíaco.

Actualmente no se dispone de ninguna terapia que revierta al 100% el fenotipo de la enfermedad. La mayoría de tratamientos disponibles son sintomáticos y destinados a atenuar las alteraciones derivadas de las malformaciones esqueléticas, así como también mejorar la calidad de vida de los pacientes y de las familias.

4.10.1. Tratamiento sintomático

4.10.1.1. Complicaciones respiratorias

Las obstrucciones de la tráquea son una de las principales complicaciones que generan riesgo de muerte en estos pacientes, debido a las apneas y complicaciones derivadas (Doherty et al., 2018; Tomatsu et al., 2016). Actualmente, la única solución para corregir estas obstrucciones es la intervención quirúrgica (Pizarro et al., 2016; Tomatsu et al., 2016). La principal dificultad en este tipo de cirugías radica en la anestesia durante la intervención debido a la dificultad en la intubación de estos pacientes (Theroux et al., 2012).

4.10.1.2. Complicaciones ortopédicas

Durante los primeros años de vida, el 70% de los pacientes de Morquio A con un fenotipo severo desarrollan complicaciones musculoesqueléticas tales como el *pectus carinatum*, cifoescoliosis o *genu valgum*. Actualmente, la única solución para corregir la displasia esquelética es la cirugía ortopédica, principalmente a nivel cervical y de las extremidades inferiores (Montaño et al., 2007). Estas intervenciones suelen tener lugar a partir de la primera década de vida del paciente.

4.10.2. Trasplante de células madre hematopoyéticas

En 2005 la sociedad Europea de trasplantes de sangre y médula, desarrolló unas guías para el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT: *Hematopoietic Stem Cells Transplantation*) en pacientes de MPS (Aldenhoven et al., 2015).

El trasplante de HSCs se basa en la capacidad que presentan estas células para diferenciarse y generar nuevas líneas celulares sanas en la médula ósea, capaces de secretar, en este caso, la enzima GALNS y que ésta sea captada tanto por las células vecinas como las distantes.

Actualmente se han descrito 4 casos de pacientes con Morquio A tratados mediante HSCT, tres de ellos con una forma severa de la enfermedad y uno con fenotipo atenuado (Chinen et al., 2014; Wang et al., 2016; Yabe et al., 2016). Los pacientes recibieron el tratamiento entre los 4 y 15 años y actualmente tienen entre 25 y 36. En ninguno de ellos hubo rechazo del material donado por parte del receptor y en todos ellos se consiguieron elevados niveles de actividad GALNS en linfocitos de los pacientes después del tratamiento. Además, el HSCT permitió una mejoría de la capacidad pulmonar, un incremento de la densidad ósea, mejoría de la capacidad locomotora, y una disminución en el número de intervenciones quirúrgicas y de afecciones en las válvulas cardíacas.

La principal limitación de esta terapia es la falta de reversión de la corta estatura de los pacientes. Únicamente en el paciente tratado a una edad más temprana (4 años) se consiguió un leve incremento de su estatura respecto a pacientes de su misma edad sin HSCT. Sin embargo, este incremento sigue estando muy lejos de la media de altura de pacientes sanos.

4.10.3. Terapia de reemplazo enzimático

La producción de la enzima GALNS recombinante (rGALNS) se ha llevado a cabo en células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) (Dvorak-Ewell et al., 2010; Tomatsu et al., 2007b), *Escherichia coli* (Alejandra et al., 2013) y *Pichia pastoris* (Rodríguez-López et al., 2016).

Estudios preclínicos con rGALNS producida en células CHO y administrada por vía intravenosa, demuestran que la enzima se acumula, principalmente, en el hígado y, en menor cantidad, en otros tejidos como el bazo, la médula ósea, el fémur e incluso en la placa de crecimiento y las válvulas del corazón. Sin embargo, la proteína es indetectable

48h después de su administración (Dvorak-Ewell et al., 2010; Tomatsu et al., 2007b, 2008). La infusión semanal de 250 U/g de rGALNS a los modelos murinos de MPS IVA KO y KI humanizado, durante 12 semanas, demostró una completa reducción del depósito patológico de GAGs en hígado, bazo y médula ósea. Sin embargo, este tratamiento no fue capaz de reducir el acúmulo de GAGs de las placas de crecimiento (Tomatsu et al., 2008).

En estudios posteriores se desarrolló un enzima GALNS recombinante con una cola de residuos de hexaglutamato en el extremo N-terminal de la proteína. De esta manera, se pretendía conseguir una mayor captación o retención de la proteína en el hueso, ya que el hexaglutamato tiene carga negativa y el principal componente del hueso, la hidroxiapatita (HA), tiene carga positiva (Tomatsu et al., 2010b). Esta enzima modificada fue detectable hasta 48h post-infusión en el hueso y médula ósea y también permitió la reducción de GAGs en los distintos tejidos, tanto en ratones adultos como en ratones recién nacidos. Además, en el caso de los ratones recién nacidos, el tratamiento prematuro permitió una reducción parcial del depósito de GAGs en el hueso, una correcta disposición de las células en la placa de crecimiento y una mayor reducción de GAGs en las válvulas del corazón (Tomatsu et al., 2010b, 2015).

La ERT para Morquio A fue aprobada en Europa y Estados Unidos el 14 de febrero de 2014. Se trata de una proteína recombinante producida en células CHO, llamada *Elosulfase Alfa (VimizimTM)*, producida por BioMarin Pharmaceutical Inc. (Sanford and Lo, 2014) y se administra por vía intravenosa. La fase I/II del ensayo clínico incluyó a 20 pacientes y la fase III a 176 (Hendriksz et al., 2014, 2015).

Para medir el efecto terapéutico de *VimizimTM* en la fase I/II se determinó como objetivo clínico principal el test de la marcha de los 6 minutos o 6MWT de sus siglas en inglés (*6 Minutes Walking Test*) y se observó que éste estaba mejorado en aquellos pacientes que recibieron la dosis de 2 mg/kg semanalmente, mientras que los pacientes que recibieron la dosis de 2 mg/kg cada dos semanas no presentaron cambios estadísticamente significativos respecto al grupo placebo (Hendriksz et al., 2014).

El objetivo clínico secundario del estudio fue el test de subir escaleras en 3 minutos o 3MSCT de sus siglas en inglés (*3 Minutes Stair Climb Test*) y en este caso ninguno de los grupos de tratamiento presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo placebo (Hendriksz et al., 2014).

Además, la administración semanal de *VimizimTM* permitía una mejora en la capacidad locomotora y una reducción de la captación de oxígeno relativo al ejercicio

(VO₂/watt) (Burton et al., 2015). Sin embargo, la ERT para Morquio A no ha sido capaz de mejorar los problemas auditivos, cardíacos, la opacidad corneal ni el crecimiento de los huesos largos de las extremidades inferiores (Hendriksz et al., 2014, 2015). El tratamiento permite disminuir en más de un 40% el contenido de QS en orina, aunque los valores del grupo tratado semanalmente sigue siendo significativamente mayor al de pacientes sanos (Donida et al., 2015). La reducción de los niveles de QS en orina en los pacientes no permite predecir ninguna mejoría en la patología esquelética ni en la función de los condrocitos (Sawamoto et al., 2016).

En estudios realizados en pacientes menores de 5 años se observó una mayor mejoría en el crecimiento, respecto a pacientes tratados a edades más avanzadas, lo que sugiere que la *Elosulfase Alfa* podría mejorar el crecimiento de estos pacientes (Jones et al., 2015).

Los principales efectos secundarios del tratamiento con ERT que se han descrito son: pirexia, vómitos, dolor de cabeza, náuseas, dolor abdominal y fatiga. En el ensayo clínico, 25 de los pacientes presentaron efectos adversos graves, tales como anafilaxis o reacciones de hipersensibilidad que se tradujeron en disnea, broncoespasmos, tos, hipoxia, hipotensión, enrojecimientos, angioedema de la garganta, urticaria y síntomas gastrointestinales (Burton et al., 2015; Hendriksz et al., 2014, 2015).

El 100% de los pacientes desarrollaron anticuerpos anti-*Elosulfase Alfa* y más del 80% desarrollaron anticuerpos que impedían la unión de la enzima recombinante a los M6PR. Sin embargo, no se ha descrito correlación entre la hipersensibilidad y la generación de anticuerpos anti-*Elosulfase Alfa*, al igual que tampoco se ha documentado correlación entre la generación de anticuerpos y la eficacia clínica (Schweighardt et al., 2015).

4.10.4. Terapias en desarrollo

4.10.4.1. Terapia de aumento de actividad enzimática

Las terapias de aumento de actividad enzimática o *Enzyme Enhancement Therapies* ofrecen la posibilidad de aumentar la actividad residual de las enzimas lisosomales mutadas. Estas terapias se basan en el uso de “chaperonas farmacológicas” con la finalidad de reconocer enzimas con plegamientos defectuosos y favorecer el plegamiento correcto, permitiendo de esta manera que se recupere su actividad enzimática. De esta manera se incrementa la actividad residual de la enzima

pudiendo alcanzar el *plateau* terapéutico de actividad necesario para disminuir el depósito lisosomal de la mayoría de LSDs (Schueler et al., 2004).

Para la MPS IVA se han estudiado 2 moléculas (MoIEIM-1 y MoIEIM-2) que actúan como chaperonas sobre la enzima GALNS. Ambas moléculas han demostrado, *in vitro*, la capacidad de unión al centro activo de GALNS de fibroblastos de pacientes MPS IVA y un incremento de actividad 24h después de su administración, alcanzando niveles iguales a los de fibroblastos de pacientes sanos. Además, se ha observado la capacidad de estas moléculas para incrementar la actividad de la proteína recombinante que se administra en la ERT. Por lo tanto, estas chaperonas se podrían administrar para tratar a aquellos pacientes de Morquio A con mutaciones que impiden el correcto plegamiento de GALNS, y también como un coadyuvante a la terapia de reemplazo enzimático (Alméciga-Díaz et al., 2018).

4.10.4.2. Trasplante de células madre mesenquimales de cordón umbilical

Las células madre mesenquimales humanas de cordón umbilical (*hUMSC: human Umbilical cord-derived Mesenchymal Stem Cell*), a diferencia de las HSCs, tienen la capacidad de diferenciarse en células no hematopoyéticas. El uso de hUMSC ha demostrado eficacia en la mejoría de los defectos de la córnea en otras enfermedades (Ziaei et al., 2017). Actualmente, se han desarrollado estudios *in vitro* que determinan que estas células son capaces de secretar la enzima GALNS al medio, donde ésta es captada por fibroblastos deficientes en GALNS, consiguiendo un incremento del 20-45% en la actividad enzimática. Los estudios actuales se están encaminando hacia la inyección de este tipo de células en el estroma de la córnea de ratones MPS IVA (Flanagan et al., 2018).

4.10.4.3. Terapia de degradación de sustrato

En el contexto de la MPS IVA, las terapias de degradación de sustrato (*SDET: Substrate Degradation Enzyme Therapy*) son aquellas que tienen como finalidad degradar QS o C6S, disminuyendo así su acumulación.

Actualmente, se está utilizando la enzima Keratanasa para degradar el QS presente tanto en los tejidos como en la sangre, ya que esta enzima puede actuar en un rango de pH muy amplio, siendo activa tanto en el MEC como en el interior de los lisosomas. Se ha observado que la administración intravenosa, cada 4 semanas, de 2 U/Kg de

Keratanasa, en ratones MPS IVA KO recién nacidos o en animales de 8 semanas de edad, reduce los niveles de QS en suero y permite una mejoría de la patología ósea (Tomatsu et al., 2018).

5. TERAPIA GÉNICA

Ante las limitaciones que presentan los tratamientos actuales para la MPS IVA, se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Una de las alternativas que está tomando más fuerza en los últimos años en diferentes estudios preclínicos de LSDs, y en concreto para diferentes MPSs, es la terapia génica (Sawamoto et al., 2017).

La terapia génica es la estrategia clínica basada en la modificación del material genético de la célula mediante la introducción de material genético exógeno con la finalidad de prevenir, corregir o aliviar los síntomas de una enfermedad. Para ello, se pueden introducir nuevos genes o incrementar la expresión génica, silenciar o disminuir los niveles de expresión de ciertos genes o incluso corregir la secuencia nucleotídica de genes mutados (edición génica) (Naldini, 2015).

La terapia génica se divide en 2 grandes grupos en función de la metodología utilizada: terapia génica *ex vivo* y terapia génica *in vivo*.

La terapia génica *ex vivo* consiste en obtener células de pacientes o modelos animales de una determinada enfermedad, generalmente HSCs, modificarlas genéticamente *in vitro* utilizando el vector más apropiado, y reintroducirlas en el paciente o modelo animal en cuestión.

Por otro lado, la terapia génica *in vivo* consiste en la modificación de las células o tejido de interés *in situ* en el individuo.

En función del vector utilizado para la administración del DNA, la terapia génica también se puede subdividir en viral y no viral. Las estrategias de terapia génica no virales se basan en la administración de DNA desnudo mediante electrotransferencia o mediante diferentes métodos fisicoquímicos, como pueden ser la encapsulación del material genético en liposomas o en polímeros catiónicos (Aronovich et al., 2009; Baldo et al., 2012; Osborn et al., 2011).

La terapia génica viral aprovecha las propiedades infectivas de los vectores virales, derivados de virus salvajes, para la introducción del material genético en el interior de las células diana. A diferencia de los vectores no virales, los vectores virales presentan especificidad de unión a receptor, lo que determina el órgano, tejido o célula diana; elevada eficiencia de transducción y expresión génica a largo término. Concretamente, la expresión a largo término, y la posibilidad de secreción del producto al riego sanguíneo y su distribución por todo el organismo, permite que la terapia génica viral se postule como la terapia de elección para el desarrollo de un posible tratamiento no sólo para las MPSs, sino también para gran parte de las enfermedades hereditarias monogénicas. Actualmente, los vectores virales adenoasociados (AAV) son los más utilizados en la mayoría de estrategias de terapia génica *in vivo* debido a su excelente perfil de seguridad, su baja inmunogenicidad, su no patogenicidad y su habilidad para mediar expresión del transgén de interés durante años en una amplia variedad de tejidos (Mingozzi and High, 2011).

5.1. Vectores virales adeno-asociados

Los vectores virales adeno-asociados derivan de virus humanos de la familia *Parvoviridae*. Los AAVs no provocan ninguna patología humana conocida y se descubrieron por primera vez como contaminantes en preparaciones de Adenovirus (Atchison et al., 1965; Hoggan et al., 1966). Forman parte del género *Dependoviridae*, que en general son virus poco inmunogénicos, no patogénicos y no autónomos. Esto implica que no se pueden replicar por ellos mismos, sino que necesitan de la coinfección de virus accesorios, como pueden ser los Adenovirus o los Herpesvirus, para completar su ciclo vital (Lentz et al., 2012). Estas características naturales de los AAVs permiten que los vectores virales recombinantes derivados de estos virus sean seguros y presenten baja probabilidad de aparición de efectos secundarios como consecuencia de su administración en protocolos de terapia génica.

5.1.1. Biología de los virus adeno-asociados

Los AAVs salvajes pertenecen al grupo de virus sin envuelta lipídica. Son partículas icosaédricas de 20 nm de diámetro con cápside proteica (Xie et al., 2002) y con un genoma de DNA de cadena sencilla (ssDNA) de aproximadamente 4,8 kb, formado por dos genes: el gen *Rep*, codificando para proteínas implicadas en la replicación y el gen *Cap*, que codifica para proteínas estructurales de la cápside. La expresión génica está

controlada por tres promotores diferentes que dan lugar a tres marcos abiertos de lectura (ORF: *Open Reading Frame*). Por mecanismos de *splicing* alternativo en estos dos genes, se generan las 7 proteínas virales. Cuatro implicadas en la replicación y estabilización del DNA (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40) derivadas del gen *Rep* y tres que forman la cápside (VP1, VP2 y VP3) derivadas del gen *Cap* (Figura 10). Son precisamente las proteínas de la cápside proteica las que confieren la capacidad de unión al receptor y correceptor y por lo tanto, las que determinan el tropismo, el cual varía en función del serotipo (Tabla 8). Se han descrito, identificado y caracterizado multitud de serotipos diferentes de AAV humanos (serotipos 1, 2 y 5) y de primates (serotipos 7, 8, 9 y rh10), entre otros (Gao et al., 2002, 2005). Debido a la variabilidad de tropismo, varios estudios se centran en su caracterización para la utilización de estos AAVs como vectores virales para el desarrollo de aproximaciones de terapia génica para el tratamiento de enfermedades humanas.

El genoma viral de los AAVs se encuentra flanqueado en 5' y 3' por secuencias terminales repetitivas e invertidas (ITR: *Inverted Terminal Repeats*) que contienen las funciones en *cis* necesarias para la replicación, empaquetamiento e integración del genoma viral (Samulski et al., 1989; Srivastava et al., 1989). Las ITRs forman una estructura en forma de T dando lugar a un *loop* por complementariedad dentro de la propia secuencia (Nash et al., 2008) (Figura 10).

El tráfico de las partículas víricas desde el medio extracelular al interior del núcleo no se conoce completamente, aunque parece que en algunos serotipos puede estar mediado por endocitosis en vesículas con revestimiento de clatrina (Schultz and Chamberlain, 2008).

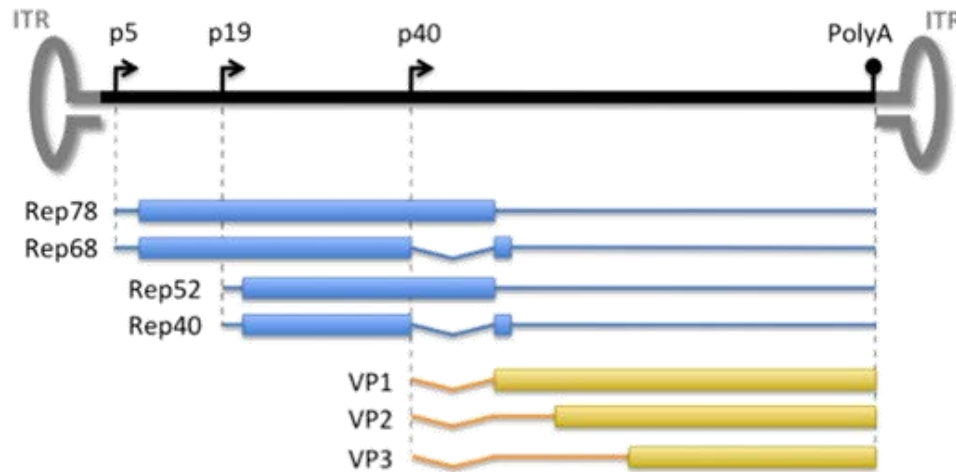


Figura 10. Representación esquemática del genoma del AAV de serotipo 2. El genoma viral se encuentra flanqueado por dos secuencias ITR. Las flechas indican la posición de los tres promotores p5, p19 y p40 codificantes para los 3 ORFs. Todos los transcritos comparten la misma señal de poliadenilación (PolyA). Adaptado de (Daya and Berns, 2008).

Tabla 8. Receptores, co-receptores y tropismo de los principales serotipos de AAVs

Serotipo	Receptor	Co-Receptor	Tropismo
AAV1	Ácido Siálico	Desconocido	Músculo esquelético, SNC, retina, páncreas
AAV2	Heparán Sulfato	FGFR1, HGFR, LamR	Células musculares vasculares, músculo esquelético, SNC, hígado, riñón
AAV3	Heparán Sulfato	FGFR1, HGFR, LamR	Músculo esquelético, hepatocarcinoma
AAV4	Ácido Siálico	Desconocido	SNC (ependimocitos), retina
AAV5	Ácido Siálico	PDGFR	Músculo esquelético, SNC, ependimocitos, pulmón, retina
AAV6	Ácido Siálico	EGFR	Músculo esquelético, corazón, pulmón
AAV7	Desconocido	Desconocido	Músculo esquelético, SNC, retina
AAV8	Desconocido	LamR	Hígado, músculo esquelético, SNC, retina, páncreas, corazón, tejido adiposo
AAV9	Galactosa N-unida	LamR	Hígado, corazón, pulmón, SNC, músculo esquelético, páncreas, riñón, tejido adiposo

FGFR1: Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos tipo 1; HGFR: Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos; LamR: Receptor de Laminina; PDGFR: Receptor del Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas; EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico. Adaptado de (Lentz et al., 2012).

Una vez en el núcleo celular, la síntesis de la cadena complementaria de DNA viral, paso crítico y limitante en la replicación viral, requiere tanto de la maquinaria enzimática celular (Nash et al., 2008) como de la expresión del gen viral *Rep*, dando lugar a las diferentes proteínas Rep78, 68, 52 y 40 (Im and Muzyczka, 1992). En ausencia de un virus accesorio, el genoma viral puede persistir de forma episomal formando monómeros o uniéndose, dando lugar a concatámeros circulares (Schnepp et al., 2005). Además, la integración del genoma viral, a pesar de que puede darse con muy baja frecuencia, cuando tiene lugar se da, preferentemente, en lugares específicos del cromosoma 19 humano (McCarty et al., 2004), generalmente en lugares transcripcionalmente activos o con presencia de roturas de doble cadena (Miller et al., 2002; Nakai et al., 2003).

5.1.2. Características de los vectores AAVs

Los vectores virales derivados de los AAVs se generan sustituyendo el genoma viral codificante para las proteínas REP y CAP, contenidos entre las dos ITRs, por el constructo de DNA de elección, sin superar el máximo de encapsidación de estos vectores, que es de aproximadamente 4,7 kb. Como consecuencia, los vectores pierden la capacidad de expresión de proteínas virales, minimizando la acción del sistema inmunitario contra las células transducidas, aunque se han descrito ciertas respuestas inmunes desencadenadas por vectores AAVs en humanos, debidas al reconocimiento de proteínas de la cápside (Manno et al., 2006; Mingozzi et al., 2009). La mayoría de vectores virales utilizados en aproximaciones de terapia génica están basados en el genoma del AAV2, uno de los serotipos mejor caracterizados (Samulski et al., 1982; Srivastava et al., 1989).

Como ocurre en los AAVs salvajes, las proteínas de la cápside confieren la especificidad de unión a receptores (Tabla 8) y su baja tasa de inserción en el genoma aún se ve más reducida debida a la ausencia de los genes virales *Rep78* y *Rep68* (McCarty et al., 2004), hecho que disminuye la probabilidad de que aparezcan alteraciones debidas a mutaciones insercionales.

Los vectores AAVs pueden ser producidos y purificados a títulos elevados en el laboratorio (Ayuso et al., 2010a). Generalmente, la producción se realiza por un sistema de triple transfección con la participación de 3 plásmidos proporcionados en *trans* (Figura 11). Uno de los plásmidos contiene el *cassette* de expresión de interés flanqueado por las secuencias ITRs. Un segundo plásmido accesorio, sin ITRs, codifica para las proteínas virales REP y CAP. Ambos plásmidos son cotransfectados en una

línea celular HEK293 juntamente con un tercer plásmido codificante para las proteínas adenovirales necesarias para la replicación de los vectores AAVs. De esta manera, se consigue encapsidar únicamente el material genético comprendido entre las ITRs, evitando la encapsidación de los genes virales (Lai et al., 2010; Wu et al., 2010). La especificidad del serotipo viene dada por el gen *Cap*, que codifica para las proteínas VP. De esta forma la combinación del gen *Rep* del AAV2 con el gen *Cap* de otros serotipos permite obtener partículas virales con las ITRs del AAV2 pero con la cápside proteica característica de otros serotipos (Grimm et al., 2008; Rabinowitz et al., 2002).

El método de purificación que separa más eficientemente las cápsides vacías de las que contienen genoma (cápsides llenas) es la purificación por gradiente de cloruro de cesio (CsCl) (Ayuso et al., 2010b). En particular, la precipitación con polietilenglicol (PEG) y la purificación mediante CsCl, descritas por nuestro laboratorio, reducen significativamente las cápsides vacías y las impurezas de DNA y proteína, lo que aumenta la pureza de la preparación viral y, por consiguiente, la eficiencia de transducción *in vivo* (Ayuso et al., 2010b).

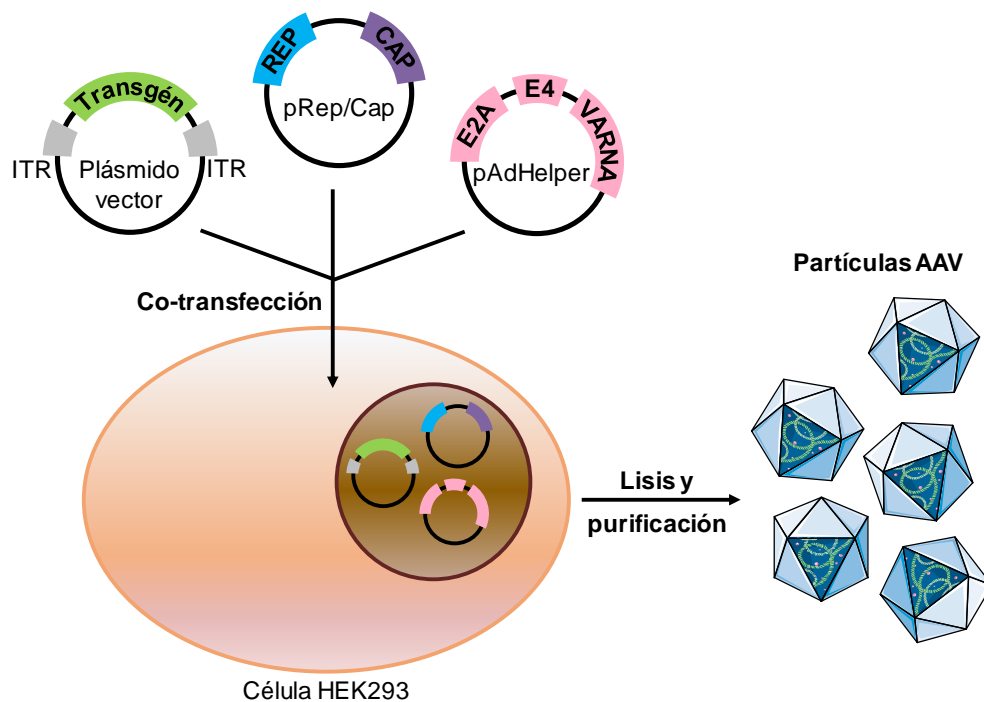


Figura 11. Producción de los vectores AAVs recombinantes (rAAV) mediante el método de triple transfección. Para producir los vectores rAAV se transfectan células HEK293 con tres plásmidos. Ambos genes (*Rep* y *Cap*) se reemplazan por el transgén flanqueado por las señales virales de empaquetamiento (ITRs) para crear el plásmido vector; las proteínas Rep y Cap las aporta en *trans* el plásmido pREP/CAP y las funciones propias de un virus auxiliar necesarias para la producción de los AAVs las aporta el tercer plásmido pAdHelper. Posteriormente, las partículas de vector se purifican a partir del lisado celular con tal de obtener cápsides llenas de DNA. Adaptado de (Ayuso et al., 2010b).

6. TERAPIA GÉNICA PARA LA MPS IVA

Actualmente, no hay ningún ensayo clínico aprobado para el tratamiento de pacientes de Morquio A mediante terapia génica.

En ensayos preclínicos para el tratamiento de esta enfermedad mediante terapia génica, se han utilizado diversos vectores: γ -retrovirus, lentivirus y AAVs.

6.1. Transferencia génica con vectores retrovirales y lentivirales

El primer trabajo de terapia génica para la MPS IVA fue el desarrollado por Toietta *et al.* en 2001, en el que se empleó un vector retroviral portando el gen *GALNS* humano para transducir fibroblastos y linfocitos de sangre periférica de individuos sanos y pacientes de Morquio A, así como queratinocitos humanos, mieloblastos de ratón y sinoviocitos de conejo. El uso de este vector permitió obtener valores de actividad enzimática entre 5 y 50 veces por encima de los medidos en células sanas, así como una normalización del contenido en GAGs (Toietta *et al.*, 2001).

Al igual que con los vectores retrovirales, los vectores lentivirales para el tratamiento del síndrome de Morquio A únicamente se ha probado de forma *in vitro*. En este estudio se observó que la transducción de fibroblastos de pacientes de Morquio A mediante lentivirus portadores del gen *GALNS* daba lugar a una mayor actividad enzimática que la transducción de fibroblastos MPS IVA mediante AAVs portadores del gen *GALNS* (co-transfectados con AAVs portadores del gen *SUMF1* o portando el gen *GALNS* y *SUMF1* conjuntamente). Este tratamiento, además, permitió la normalización de la actividad de las enzimas β -hexosaminidasa y β -glucuronidasa que han sido descritos como biomarcadores secundarios de Morquio A (Alméciga-Díaz *et al.*, 2013; Mejía, 2012; Salazar *et al.*, 2016).

6.2. Terapia génica con vectores adeno-asociados

Los primeros trabajos con vectores AAV en MPS IVA se llevaron a cabo entre 2008 y 2010, en los que se demostró la eficiente transducción de células HEK293 y fibroblastos de pacientes de Morquio A, obteniendo actividades elevadas de la enzima *GALNS*, bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) u otros promotores eucarióticos tales como el factor de elongación 1 α (EF1) o el de la α 1 antitripsina humana (hAAT) (Alméciga-Díaz *et al.*, 2009, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2008). Además, se

observó que la co-expresión de *GALNS* con *SUMF1*, permitía un aumento de hasta 4 veces la actividad enzimática en el lisado celular y la aparición de la enzima en el medio de cultivo, indicando que ésta se secretaba correctamente (Alméciga-Díaz et al., 2010).

Posteriormente se han llevado a cabo estudios *in vivo* de la terapia mediante la administración intravenosa de vectores AAV-hAAT-GALNS con y sin co-transducción con AAV-CMV-SUMF1 en ratones MPS IVA. En estos estudios se observó que doce semanas después de la administración del vector, la actividad GALNS circulante aumentaba un 8% en los ratones MPS IVA tratados con AAV-hAAT-GALNS y, aproximadamente un 20%, en los animales co-inyectados con AAV-hAAT-GALNS + AAV-CMV-SUMF1 en comparación con ratones sanos. A nivel tisular, los mayores niveles de actividad enzimática se observaron en el hígado, con valores de hasta 21% y 37% para animales AAV-hAAT-GALNS y AAV-hAAT-GALNS conjuntamente con AAV-CMV-SUMF1, respectivamente en comparación con animales sanos. Además, se observó que la co-inyección de los vectores AAV-hAAT-GALNS y AAV-CMV-SUMF1 permitía un incremento de actividad GALNS del 30% en el corazón y del 33% en el hueso de ratones MPS IVA (Alméciga-Díaz et al., 2012).

Posteriormente, se realizó un estudio en el que se diseñó un vector AAV que transportaba una señal de direccionamiento al hueso en su cápside, con el objetivo de alterar el tropismo natural del vector y permitir una mayor transducción del hueso. El análisis *in vitro* de este vector demostró tener una afinidad por la hidroxiapatita del 100%. Además, el estudio *in vivo* de este vector permitió detectar niveles de transducción del hueso mucho más elevados que los observados con el vector nativo. El vector AAV con el señal de direccionamiento al hueso, también demostró su capacidad *in vivo* para transducir otros órganos como el hígado y el corazón (Alméciga-Díaz et al., 2012; Tomatsu et al., 2010c).

Ninguno de los estudios de terapia génica mencionados anteriormente ha demostrado corrección en los niveles de GAGs ni ningún otro dato de eficacia terapéutica más allá del incremento de actividad GALNS en el hueso y otros tejidos periféricos.

III. Objetivos

La Mucopolisacaridosis IVA es una enfermedad minoritaria caracterizada por una progresiva y severa displasia esquelética junto con otras anomalías no esqueléticas que afectan principalmente a las vías respiratorias, al corazón y a la córnea. A pesar de que se puede presentar en diferentes formas de evolución, la más grave es la de aparición infantil que lleva a la muerte de los pacientes entre la segunda y tercera década de vida. Las terapias actuales para el tratamiento de la patología no son capaces de revertir todos los aspectos clínicos de la enfermedad. Por esta razón, se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento. La terapia génica *in vivo* basada en la administración de vectores virales adenoasociados se presenta como una de las alternativas terapéuticas más prometedoras, ya que permite la expresión a largo término de la proteína deficitaria.

El objetivo general del presente estudio fue **desarrollar una aproximación de terapia génica para el tratamiento de la Mucopolisacaridosis tipo IVA**. Este objetivo principal se subdividió en los siguientes *objetivos específicos*:

- 1. Generar y caracterizar un ratón *Knock out* modelo de la MPS IVA con déficit de la enzima GALNS.**
- 2. Determinar el serotipo de AAV capaz de ofrecer una mayor transducción del hueso y de otros órganos y tejidos afectados en pacientes de Morquio A.**
- 3. Evaluar los efectos de la administración intravenosa de un vector viral adenoasociado de serotipo 9 codificante para la proteína GALNS en ratones modelo de la MPS IVA.**

IV. Resultados

***Parte 1. Generación y caracterización del
modelo murino de MPS IVA***

1. GENERACIÓN DE UN RATÓN DEFICIENTE EN *Galns*

Con la finalidad de obtener un ratón deficiente en *Galns* se obtuvieron células madre embrionarias de ratón (mESC) que se habían manipulado genéticamente para disrupir el gen *Galns*. Estas mESC se obtuvieron del *International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC)*, (www.mousephenotype.org). Se escogieron tres clones distintos (Tabla 9) que presentaban una disrupción del gen *Galns* tras la manipulación con el vector de recombinación *PG00202_Z_1_F07* (Figura 12A). En las mESC, este vector de recombinación estaba insertado en la región intrónica entre los exones 2 y 3 del gen *Galns*. El vector de recombinación también contenía el gen LacZ que, al integrarse en el genoma durante el proceso de recombinación homóloga, expresará la proteína β -Galactosidasa bajo el promotor endógeno de *Galns*. El propio codón STOP del gen LacZ provocaba que la transcripción de *Galns* quedase interrumpida entre los exones 2 y 3, dando lugar a una proteína no funcional.

Tabla 9. mESC portadoras de la disrupción en el gen *Galns*

Clon mESC	Fondo genético	Vector de recombinación	Alelo	Línea parental
EPD0597_3_E01	C57BL6/N-A/a	PG00202_Z_1_F07	<i>Galns</i> ^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}	JM8A3N1
EPD0597_3_D01	C57BL6/N-A/a	PG00202_Z_1_F07	<i>Galns</i> ^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}	JM8A3N1
EPD0597_3_D04	C57BL6/N-A/a	PG00202_Z_1_F07	<i>Galns</i> ^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}	JM8A3N1

Todos los clones se analizaron a nivel de cariotipo (ver Materiales y Métodos). Finalmente, se decidió utilizar el clon EPD0597_3_D01, ya que era el que presentaba un mayor porcentaje de euploidia.

Estas mESC se microinyectaron en blastocitos C57BL/6JOlaHsd y los ratones quimera machos resultantes se cruzaron con hembras C57BL/6NTac con el fin de obtener ratones heterocigotos (Het) para la disrupción del gen *Galns* (*Galns*^{+/-}).

Los ratones homocigotos para la disrupción del gen *Galns* (*Galns*^{-/-}) o ratones MPS IVA, se obtuvieron mediante cruces de animales *Galns*^{+/-}. Los diferentes grupos de animales se diferenciaron mediante genotipación por análisis de DNA genómico con PCR. El análisis en gel de agarosa del DNA obtenido en la reacción de PCR permitió observar una única banda de 153 pb en el caso de los ratones *Galns*^{-/-} y una banda de 427 pb en el caso de los ratones WT (*Galns*^{+/+}) (Figura 12B). A continuación, se analizó la expresión del gen *Galns* en los 3 grupos de animales (WT, Het y MPS IVA) y se observó que los animales MPS IVA no presentaban expresión del gen *Galns* en ninguno

de los tejidos analizados (Figura 12C). De acuerdo con estos resultados, se observó que los animales MPS IVA no presentaban niveles detectables de actividad GALNS en el hígado ni en el suero (Figura 13D).

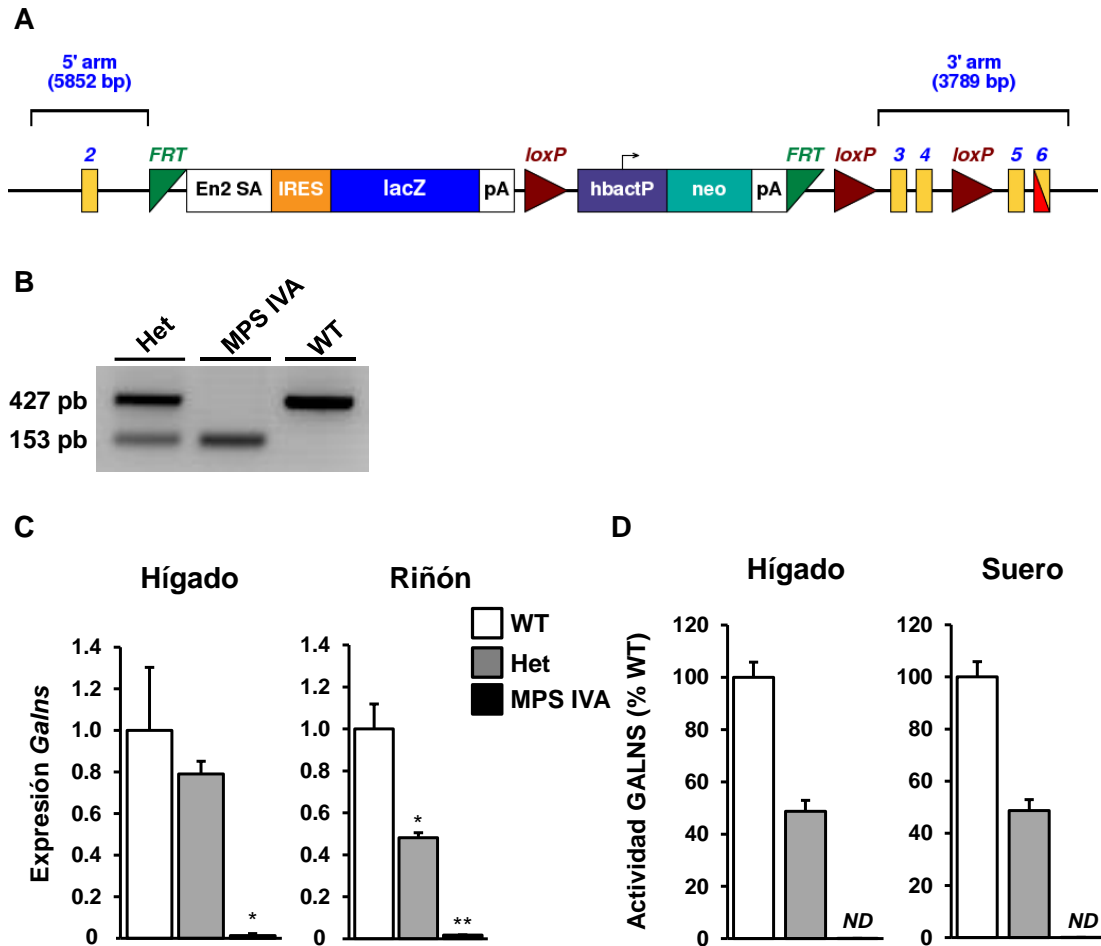


Figura 12. Generación del ratón deficiente en *Galns*. (A) Vector de recombinación PG00202_Z_1_F07 utilizado para la disrupción del gen *Galns* (IMPC, www.mousephenotype.org). (B) Genotipación de ratones WT, heterocigotos (Het) y homocigotos (MPS IVA) para la disrupción del gen *Galns*. (C) Análisis de la expresión de *Galns* en hígado y riñón y (D) determinación de la actividad GALNS en hígado y suero de ratones WT, heterocigotos (Het) y homocigotos (MPS IVA) para la disrupción del gen *Galns*. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 2 animales por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs WT. ND: No detectable.

2. ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL RATÓN MPS IVA

Una vez obtenido el nuevo modelo animal de MPS IVA, se procedió a analizar las posibles alteraciones fenotípicas derivadas de la interrupción del gen *Galns* en este ratón.

2.1. Evaluación del fenotipo esquelético

2.1.1. Determinación de actividad GALNS en el fémur y del contenido de GAGs en la placa de crecimiento

En pacientes de Morquio A se ha observado que la principal afectación se encuentra en el sistema esquelético (Montaño et al., 2007). Con la finalidad de valorar el grado de afectación del sistema esquelético en el ratón MPS IVA, en primer lugar, se determinó la actividad enzimática GALNS en el fémur. Además, se cuantificó la presencia de los glucosaminoglicanos (GAGs) queratán sulfato (QS) y condroitín sulfato (CS) en la placa de crecimiento de ratones WT y MPS IVA, ya que se considera que la acumulación patológica de estos GAGs en los condrocitos de la placa de crecimiento es la causa de las alteraciones en la condrogénesis, que dan lugar a los problemas de crecimiento observados en los huesos de pacientes de Morquio A (Byers et al., 2018; Tomatsu et al., 2014).

El análisis de la actividad GALNS en el fémur de ratones MPS IVA reveló niveles de actividad prácticamente indetectables, en comparación con la actividad GALNS observada en ratones WT (Figura 13).

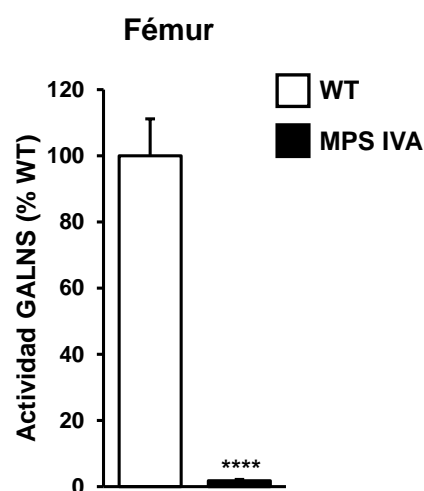


Figura 13. Determinación de actividad GALNS en fémur. Se determinó la actividad GALNS en ratones machos WT y MPS IVA de 7 meses de edad. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 3 animales por grupo. **** $p < 0.0001$ vs WT.

Para llevar a cabo el análisis de los niveles de QS y CS se utilizó la técnica de espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS).

Con este análisis se evidenció que, tanto en la tibia como en el fémur de ratones WT y MPS IVA de 7 meses de edad, el CS predominante en la placa de crecimiento es el condroitín 4-sulfato (C4S), el cual no se acumula de forma patológica en pacientes de Morquio A. En estos ratones este GAG se encuentra representado aproximadamente entre 18 y 20 veces por encima de los niveles del condroitín 6-sulfato (C6S) en la tibia y entre 18 y 25 veces de los del fémur. Además, se observó que la deficiencia de la enzima GALNS en este tejido no provocaba un acúmulo estadísticamente significativo de C6S ni en la tibia ni en el fémur de ratones MPS IVA en relación a los valores obtenidos en ratones WT (Tabla 10). En ninguno de los huesos analizados se detectaron niveles cuantificables de QS (Tabla 10), de acuerdo con estudios anteriores que indicaban la ausencia de este GAG en la composición del hueso de ratón (Venn and Mason, 1985).

Tabla 10. Cuantificación de la concentración de GAGs en la placa de crecimiento de tibia y fémur.

		GAG (ng/mg)	
		WT	MPS IVA
Tibia	C4S	268.73 ± 111.13	342.89 ± 98.07
	C6S	14.19 ± 3.36	15.04 ± 1.71
	C4S/C6S	17.71 ± 3.32	21.50 ± 3.79
	QS	ND	ND
Fémur	C4S	611.21 ± 239.52	610.36 ± 277.19
	C6S	22.13 ± 4.31	26.38 ± 6.72
	C4S/C6S	25.76 ± 5.06	18.96 ± 5.55
	QS	ND	ND

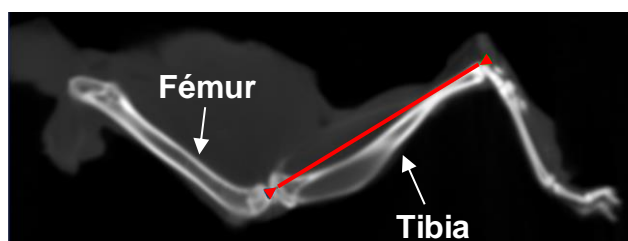
Los datos que se muestran corresponden a la media ± SEM de 3 animales por grupo. C4S: Condroitín 4-Sulfato, C6S: Condroitín 6-Sulfato, QS: Queratán Sulfato, ND: No detectable.

Estos resultados indicaban la posibilidad de que, al igual que se observó en los otros modelos de ratón de Morquio A (Tomatsu et al., 2003, 2005, 2007), el ratón MPS IVA generado en nuestro laboratorio podría no desarrollar la patología esquelética observada en los pacientes de Morquio A.

2.1.2. Estudio de microtomografía computarizada de huesos de ratón MPS IVA

Con el fin de determinar si, a pesar de la falta de acumulación patológica de GAGs en la placa de crecimiento de huesos largos, el déficit de la enzima GALNS en estos huesos era capaz de alterar su crecimiento, se llevó a cabo un estudio de microtomografía computarizada (micro-CT) de las extremidades posteriores de ratones WT y MPS IVA de 7 meses de edad. Este análisis evidenció que la falta de actividad GALNS en la tibia no alteraba de forma estadísticamente significativa el crecimiento endocondral de este hueso. Este hecho se demostró por una falta de diferencias en la longitud de estos huesos entre ratones WT y MPS IVA (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis por micro-CT de la longitud de la tibia.



Longitud Tibia (mm)	
WT	MPS IVA
17.61 ± 0.12	17.42 ± 0.03

Los datos que se muestran corresponden a la media ± SEM de 5 animales por grupo.

2.1.3. Análisis morfológico de huesos de ratones MPS IVA de 12 meses de edad

Dada la falta de diferencias en el crecimiento endocondral entre las tibias de ratones WT y MPS IVA a 7 meses de edad, se decidió realizar un nuevo análisis morfológico a los 12 meses de edad, a fin de determinar si los ratones MPS IVA eran capaces de desarrollar algún tipo de patología esquelética más a largo plazo. El estudio morfológico de estos huesos consistió en un análisis del peso y la longitud de diferentes huesos y un análisis macroscópico de cada uno de ellos, para determinar si la falta de actividad GALNS en éstos derivaba en alguna alteración en la masa ósea, en la forma o en el tamaño.

El análisis del peso y la longitud demostró una falta de diferencias en la masa ósea y el crecimiento entre los diferentes huesos de ratones MPS IVA y WT (Tabla 12).

Además, el análisis morfológico evidenció una completa ausencia de alteraciones en la forma o el tamaño de los distintos huesos analizados (Figura 13)

Tabla 12. Análisis del peso y la longitud de diferentes huesos.

	Peso (mg)		Longitud (mm)	
	WT	MPS IVA	WT	MPS IVA
Húmero	18.20± 0.45	18.00± 0.42	12.09± 0.04	12.32± 0.05
Radio	5.76± 0.14	5.54± 0.12	11.23± 0.11	11.34± 0.12
Cúbito	8.38± 0.19	8.30± 0.25	13.84± 0.13	13.82± 0.12
Fémur	34.92± 1.26	37.66± 1.11	15.29± 0.12	15.44± 0.13
Tibia	33.52± 1.10	35.80± 1.10	17.80± 0.14	18.15± 0.08
Escápula	11.36± 0.50	10.56± 0.46	-	-
Pelvis	25.98± 0.82	27.36± 0.69	-	-
Mandíbula	45.46± 0.55	46.00± 0.46	-	-

Los datos que se muestran corresponden a la media ± SEM de 5 animales por grupo.

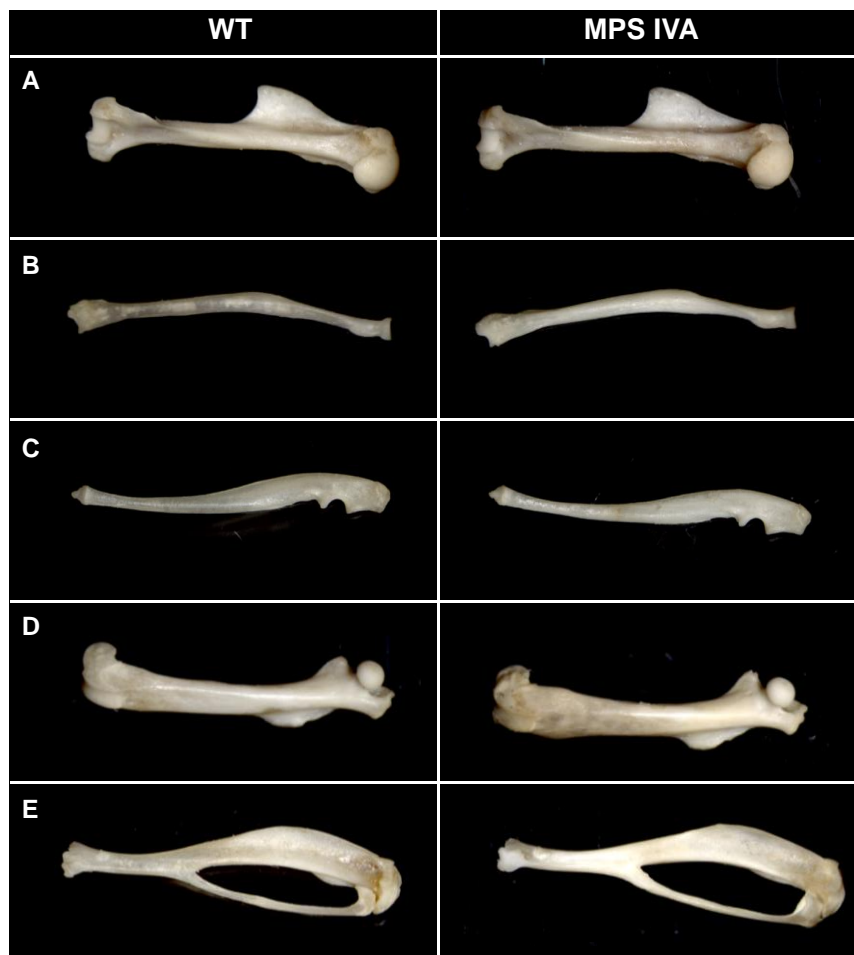


Figura 13. Comparación morfológica de diferentes huesos. Comparación morfológica de (A) húmero, (B) radio, (C) cúbito, (D) fémur, (E) tibia de ratones machos WT y MPS IVA de 12 meses de edad. Imágenes representativas de 5 animales por grupo.

2.1.4. Evaluación del crecimiento del ratón MPS IVA

Con el fin de determinar si, a pesar de la falta de alteraciones a nivel óseo, el modelo animal desarrollado en nuestro laboratorio presentaba alguna alteración a nivel de crecimiento, se realizó el seguimiento del peso de ratones MPS IVA y WT durante 26 meses. Además, dado que los pacientes de Morquio A presentan una talla corporal anormalmente reducida, se realizó un seguimiento de la longitud de ratones MPS IVA y WT durante 8 meses (Figura 14).

Se observó que la ausencia de QS y la falta de acúmulo de C6S en el hueso se traducían en ausencia de alteraciones esqueléticas que resultaban en una falta de diferencias en el peso corporal entre animales MPS IVA y WT (Figura 14A) y en una longitud indistinguible entre grupos (Figura 14B).

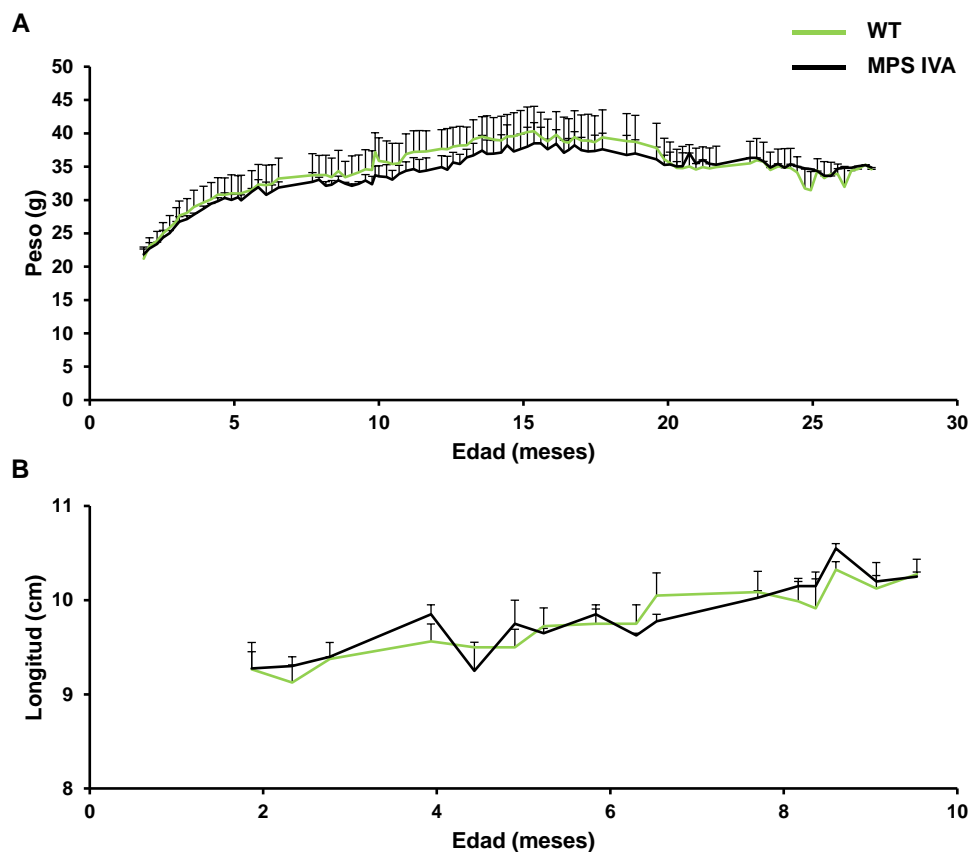


Figura 14. Seguimiento del peso y la longitud de ratones WT y MPS IVA. (A) Seguimiento del peso y **(B)** de la longitud de ratones machos WT y MPS IVA. El seguimiento del peso se llevó a cabo desde los 2 hasta los 28 meses de edad y el seguimiento de la longitud se llevó a cabo desde los 2 hasta los 10 meses de edad. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 2-4 animales por grupo.

Todos estos estudios evidenciaron que, el ratón no es un modelo animal capaz de reproducir la patología esquelética observada en los pacientes de Morquio A.

2.2. Evaluación del fenotipo somático

Paralelamente al estudio de la patología del sistema esquelético, también se llevó a cabo la valoración de otras posibles afectaciones a nivel somático.

En primer lugar, se determinó la actividad GALNS en hígado que, como ya se había observado en el caso del fémur, fue prácticamente indetectable en ratones MPS IVA (Figura 15A). Además, se observó que esta falta de actividad en el hígado provocaba un incremento progresivo en la acumulación de QS en este tejido, alcanzando, a la edad de 12 meses, niveles de 2,5 veces superior a los observados en ratones WT de la misma edad (Figura 15B).

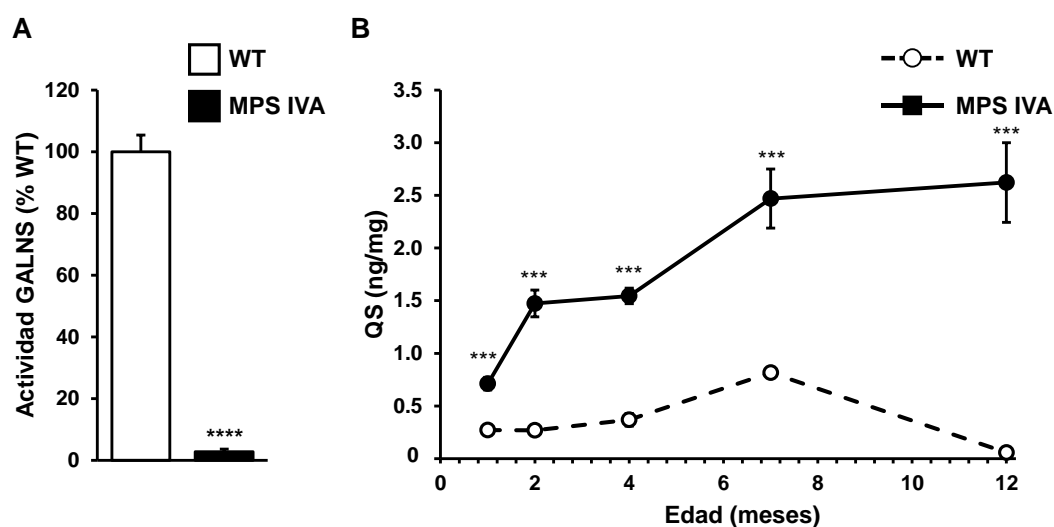


Figura 15. Determinación de actividad GALNS y cuantificación de queratán sulfato a nivel hepático. (A) Determinación de la actividad GALNS en hígados de ratones machos WT y MPS IVA de 7 meses de edad. (B) Cuantificación de los niveles de queratán sulfato a nivel hepático de animales WT y MPS IVA de 1, 2, 4, 7 y 12 meses de edad. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs WT.

A continuación, se evaluó la distensión lisosomal provocada por el acúmulo de estos GAGs en el hígado. Esta determinación se realizó mediante análisis inmunohistoquímico utilizando como marcador la presencia de la proteína lisosomal de membrana LAMP-1 (Figura 16A). La distensión lisosomal únicamente fue evidente en las células de *Kupffer*, macrófagos localizados en el hígado que forman parte del sinusoides hepático (Clària and Titos, 2004). De acuerdo con el incremento de QS con la edad en el hígado (Figura 15B), se observó que el porcentaje de señal positiva para LAMP-1 en el hígado de animales MPS IVA era mayor al observado en animales WT de la misma edad, indicando una mayor distensión lisosomal a medida que la enfermedad progresaba en ratones MPS IVA (Figura 16B).

La acumulación intralisosomal de GAGs en las células de *Kupffer* se pudo observar con más detalle en las imágenes de ultraestructura del hígado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Las imágenes obtenidas mostraban la presencia de grandes vesículas de acumulación de material poco electrodenso en las células de *Kupffer* ya a los 4 meses, edad en la que mediante inmunohistoquímica no se podía observar diferencias claras entre ratones WT y MPS IVA (Figura 16C).

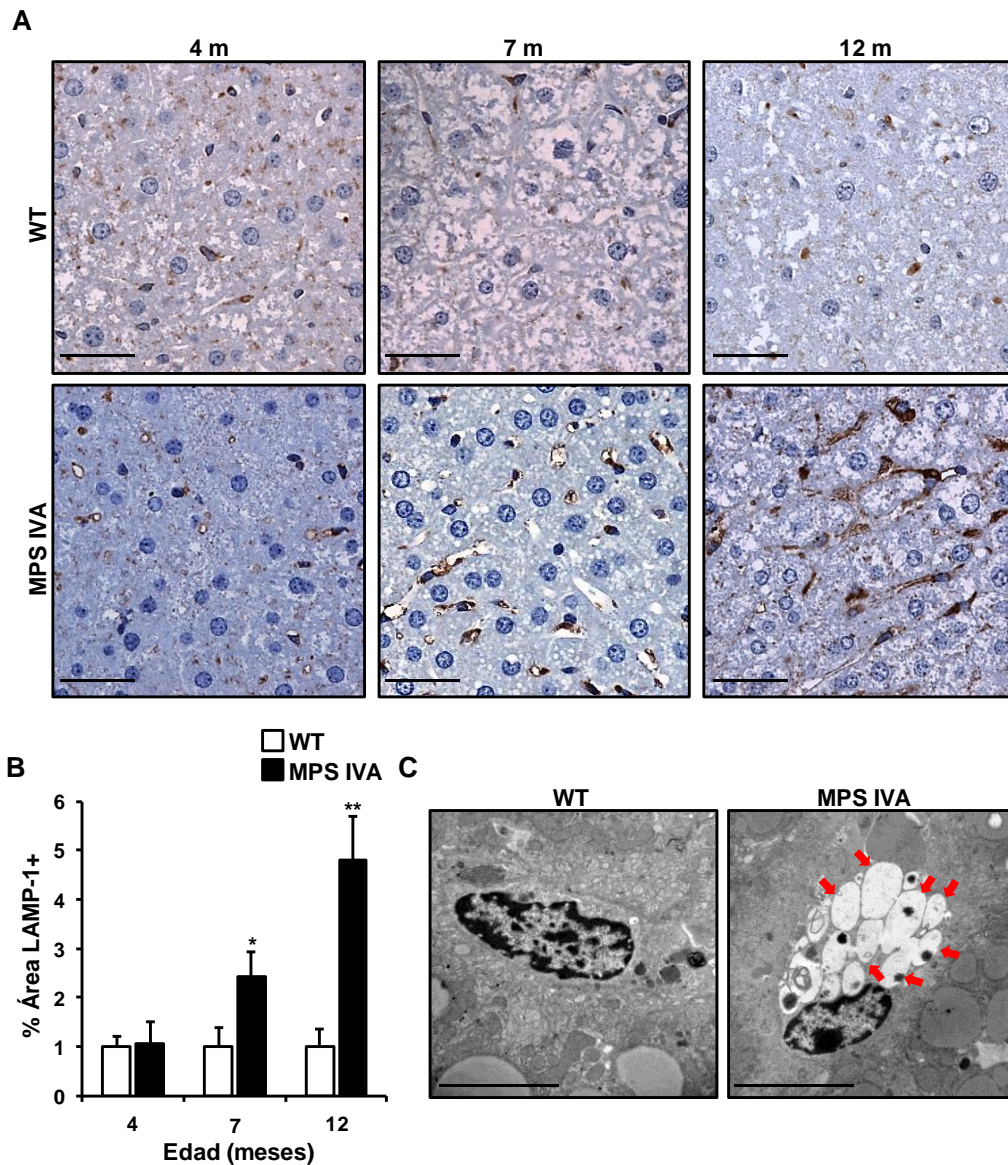


Figura 16. Incremento de la distensión lisosomal en el hígado. (A) Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado marcados con el anticuerpo específico contra LAMP-1 y (B) cuantificación del marcaje contra LAMP-1 en cortes histológicos de hígado de ratones machos WT y MPS IVA de 4, 7 y 12 meses de edad. Se pudo observar un marcaje para LAMP-1 significativamente más elevado en ratones MPS IVA de 7 y 12 meses de edad en comparación con los controles WT de la misma edad. (C) Análisis de las células de *Kupffer* por MET a 7 meses de edad en ratones machos WT y MPS IVA donde se observa un elevado contenido en vesículas de acumulación de material poco electrodenso (flechas). Imágenes representativas de 3-5 animales por grupo. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 2-5 animales por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs WT. La barra de escala indica (A) 40 μ m, (C) 5 μ m.

Al igual que en el hígado, la determinación de la actividad GALNS en suero de ratones MPS IVA evidenció unos niveles prácticamente indetectables de actividad circulante (Figura 17A). La falta de dicha actividad GALNS fue paralela a un incremento progresivo en la acumulación de QS circulante con la edad en los ratones MPS IVA. Este acúmulo de QS alcanzó niveles de aproximadamente 3 veces superior a los observados en ratones WT a la edad de 12 meses (Figura 17B). Este QS probablemente proceda de aquellas células que, debido a la incapacidad de degradar este GAG en los lisosomas, secretan su contenido al medio extracelular, pasando así a la circulación sanguínea.

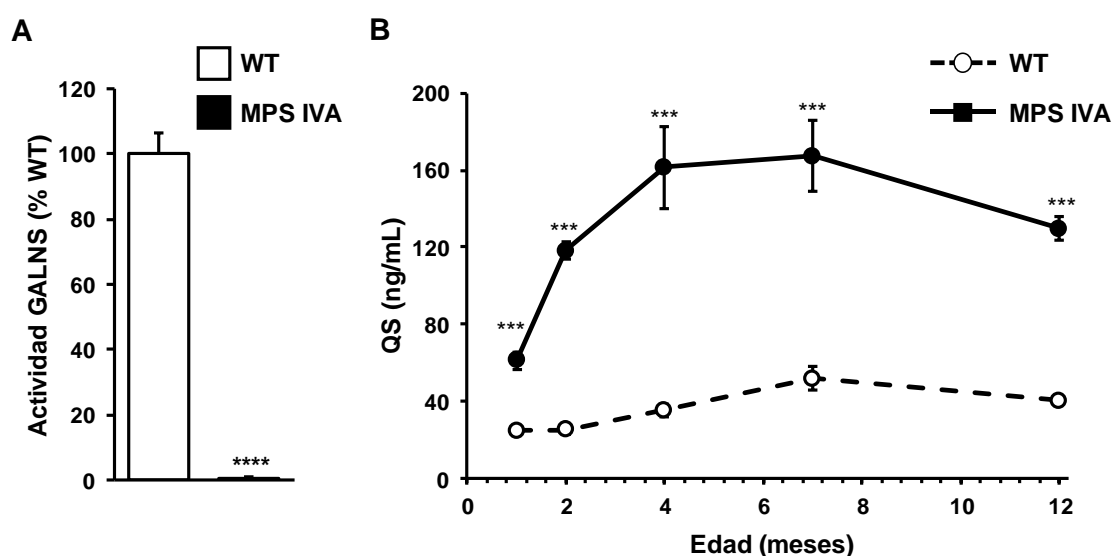


Figura 17. Determinación de actividad GALNS y cuantificación de queratán sulfato en suero. (A) Determinación de la actividad GALNS en suero de ratones machos WT y MPS IVA de 7 meses de edad. (B) Cuantificación de los niveles de queratán sulfato a nivel circulante de animales WT y MPS IVA de 1, 2, 4, 7 y 12 meses de edad. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs WT.

Los análisis mediante LC-MS/MS permitieron determinar que los niveles de queratán sulfato, tanto a nivel hepático como circulante, son bastante estables a lo largo de la vida del ratón WT. Además, quedaba patente que, tanto a nivel hepático como circulante, los animales MPS IVA de 1 mes de edad ya presentaban niveles de QS muy superiores a los observados en ratones WT de la misma edad.

Junto con el estudio de la patología a nivel hepático y circulante, se realizó una valoración de la posible patología a nivel cardíaco y de la tráquea.

El corazón y en especial las válvulas cardíacas son tejidos gravemente afectados en pacientes MPS IVA (Kampmann et al., 2016). Por este motivo se decidió analizar dicho tejido mediante microscopía electrónica. El estudio ultraestructural de las válvulas

del corazón permitió evidenciar la presencia de vesículas de acumulación en las células de la capa subendocárdica de ratones MPS IVA (Figura 18).

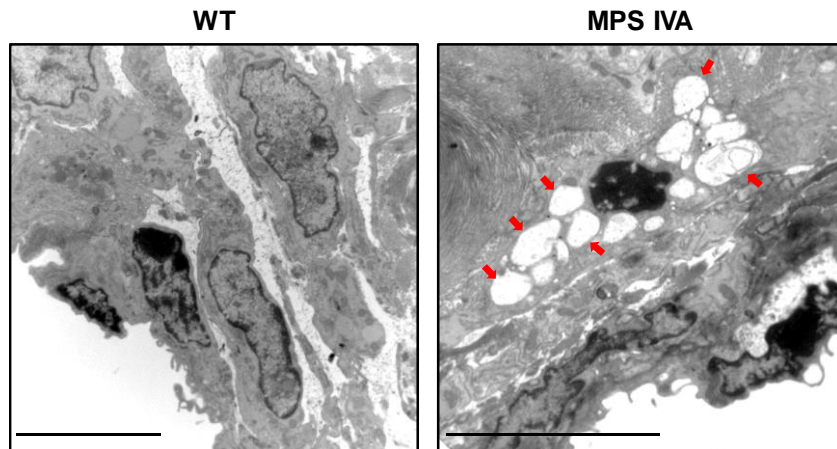


Figura 18. Incremento de la distensión lisosomal en las válvulas del corazón de ratones MPS IVA. Análisis ultraestructural de las válvulas del corazón a 4 meses de edad en ratones machos WT y MPS IVA donde se observa un elevado contenido en vesículas de acumulación de material poco electrodenso (flechas) en las células de la capa subendocárdica. Imágenes representativas de 2-3 animales por grupo. La barra de escala indica 5 μm .

La tráquea es otro de los órganos altamente afectados en pacientes de Morquio A. En este órgano la acumulación patológica de GAGs provoca obstrucciones que dificultan la intubación de los pacientes y además pueden provocar graves apneas. Por ello, se decidió cuantificar la presencia de QS y C6S en ratones WT y MPS IVA. El análisis mediante LC-MS/MS demostró que los ratones MPS IVA presentaban niveles de QS aproximadamente 2,5 veces por encima de los niveles observados en ratones WT (Figura 19).

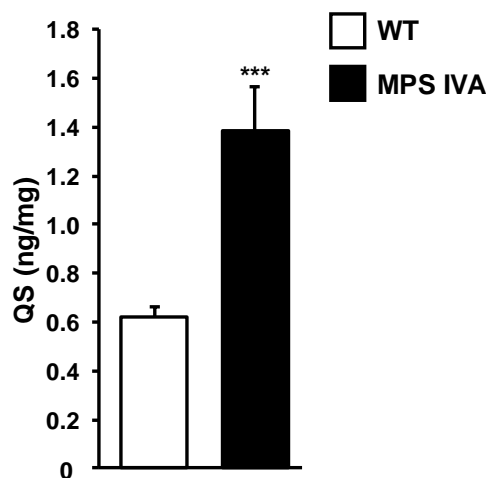


Figura 19. Cuantificación de queratán sulfato en la tráquea. Cuantificación de los niveles de queratán sulfato en la tráquea de ratones machos WT y MPS IVA de 7 meses de edad. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. *** $p < 0.001$ vs WT.

Al igual que se observó en la cuantificación del C4S y del C6S en la placa de crecimiento, la determinación de la concentración de estos GAGs en la tráquea de ratones machos WT y MPS IVA de 7 meses de edad, evidenció que el condroitín mayoritario en este órgano era el C4S, el cual se encontraba a unos niveles entre 68 y 73 veces por encima de los niveles del C6S. Además, se observó que la ausencia de la expresión de *Galns* no provocaba un acúmulo en los niveles de C6S en los animales MPS IVA respecto animales WT (Tabla 13).

Tabla 13. Cuantificación de la concentración de Condroitín Sulfato en la tráquea.

	Condroitín Sulfato (ng/mg)	
	WT	MPS IVA
C4S	3880.40 ± 241.66	4110.82 ± 469.08
C6S	58.20 ± 4.97	56.82 ± 7.77
C4S/C6S	68.40 ± 6.89	73.23 ± 2.40

Los datos que se muestran corresponden a la media ± SEM de 5 animales por grupo. C4S: Condroitín 4-Sulfato, C6S: Condroitín 6-Sulfato.

2.3. Evaluación del fenotipo ocular

En pacientes humanos de Morquio A la deficiencia del gen *Galns* da lugar a opacidad corneal, provocada por el depósito de material extracelular en la superficie de la córnea (Hendriksz et al., 2013). Por lo tanto, a continuación, se evaluó la posible patología del ratón MPS IVA a nivel ocular.

La valoración de la posible alteración en la córnea se realizó en cortes histológicos de ojos y posterior tinción de éstos mediante el método de Mowry, que permite marcar específicamente glucosaminoglicanos (ver Materiales y Métodos). El estudio se llevó a cabo en córneas de animales WT y animales MPS IVA de 7 meses de edad. Se pudo observar una mayor acumulación de GAGs (teñidos en azul) sobre la superficie del epitelio corneal en el grupo de ratones MPS IVA; que podría dar lugar a una posible opacidad corneal (Figura 20A, B). Para determinar si este depósito provocaba un engrosamiento de la córnea, se sometió a los animales a un examen ocular con lámpara de hendidura. Con este análisis se observó que el acúmulo de GAGs en la superficie de la córnea de ratones MPS IVA de 7 meses de edad generaba una tendencia a un mayor engrosamiento de la córnea, pero ésta no era estadísticamente significativa respecto a la de animales WT de la misma edad (Figura 20C).

Una vez evidenciada la alteración ocular de este modelo animal, se analizaron las glándulas lagrimales, ya que una afectación de estas glándulas y, por lo tanto, un mal funcionamiento de las mismas podría estar implicado en el acúmulo de GAGs detectado en la córnea. En primer lugar, para evaluar la posible patología de estas glándulas se determinó el contenido de QS y C6S en ratones WT y MPS IVA de 4 meses de edad mediante LC-MS/MS. Este estudio demostró que en las glándulas lagrimales de los ratones MPS IVA se acumula una gran cantidad de QS (Figura 21), al contrario de lo que se observó en los niveles de C6S, los cuales no se vieron incrementados en las glándulas de ratones MPS IVA en comparación con ratones WT. Al igual que se observó en la placa de crecimiento y en la tráquea, el condroitín sulfato mayoritario en este tejido era el C4S, el cual se encuentra a unos niveles entre 17 y 19 veces por encima de los niveles del C6S (Tabla 14).

El contenido de GAGs en las glándulas lagrimales también se determinó mediante la tinción de cortes histológicos con *toluidine blue*, un buen marcador de GAGs que revela las vesículas de acúmulo en color blanco. Esta tinción permitió visualizar una gran cantidad de vacuolas de acúmulo de QS en el interior de los alvéolos lagrimales de la glándula de ratones MPS IVA de 4 meses de edad (Figura 22A).

Estos acúmulos también se evidenciaron con un estudio de MET, en el cual las imágenes de ultraestructura de los alvéolos lagrimales revelaron la presencia de vacuolas de acúmulo de material poco electrodensito en ratones MPS IVA de 4 meses de edad (Figura 22B).

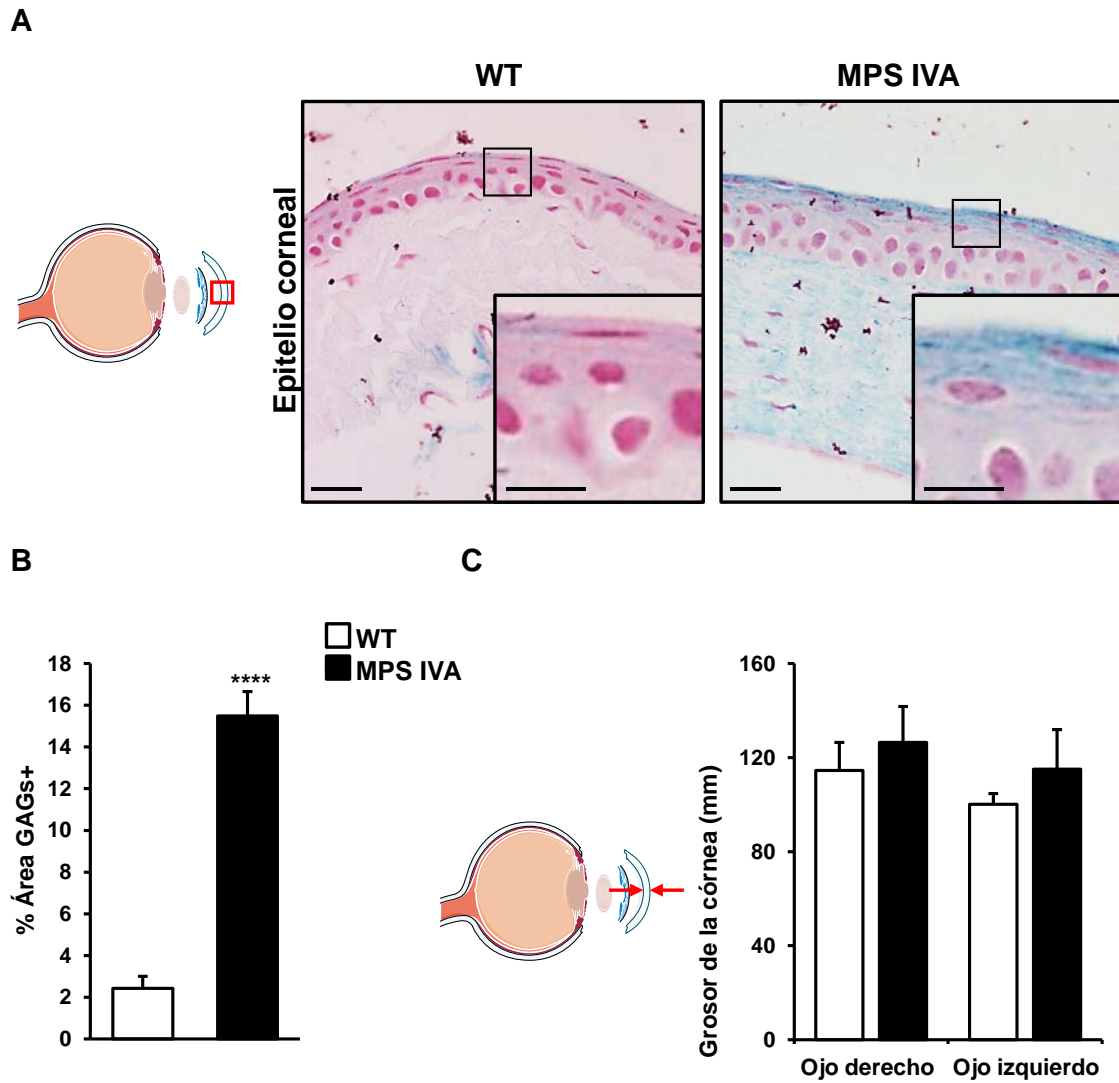


Figura 20. Evaluación de la patología de la córnea en ratones WT y MPS IVA. (A) Imágenes representativas de cortes histológicos de ojos teñidos con el método de Mowry y (B) cuantificación del área azul (contenido en GAGs) sobre el epitelio corneal de ratones machos WT y MPS IVA de 7 meses de edad. (C) Evaluación del grosor de la córnea mediante el uso de la lámpara de hendidura en ratones machos WT y MPS IVA de 7 meses de edad. Imágenes representativas de 5-8 animales por grupo. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5-8 animales por grupo. **** $p < 0.0001$ vs WT. La barra de escala indica 20 μm (10 μm *inset*).

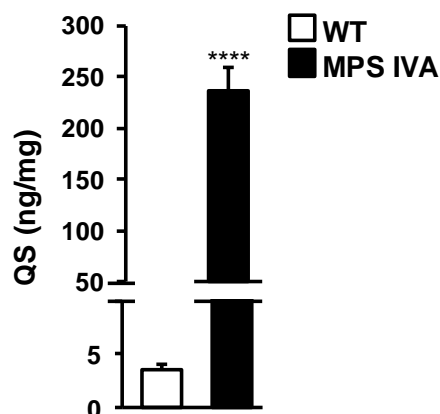


Figura 21. Determinación del queratán sulfato en la glándula lagrimal. Cuantificación de los niveles de queratán sulfato en la glándula lagrimal de ratones machos WT y MPS IVA de 4 meses de edad. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. **** $p < 0.0001$ vs WT.

Tabla 14. Cuantificación de la concentración de Condroitín Sulfato en la glándula lagrimal.

	Condroitín Sulfato (ng/mg)	
	WT	MPS IVA
C4S	82.30 \pm 5.64	58.38 \pm 2.74
C6S	4.30 \pm 0.54	3.50 \pm 0.51
C4S/C6S	19.80 \pm 2.06	17.40 \pm 1.93

Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. C4S: Condroitín 4-Sulfato, C6S: Condroitín 6-Sulfato.

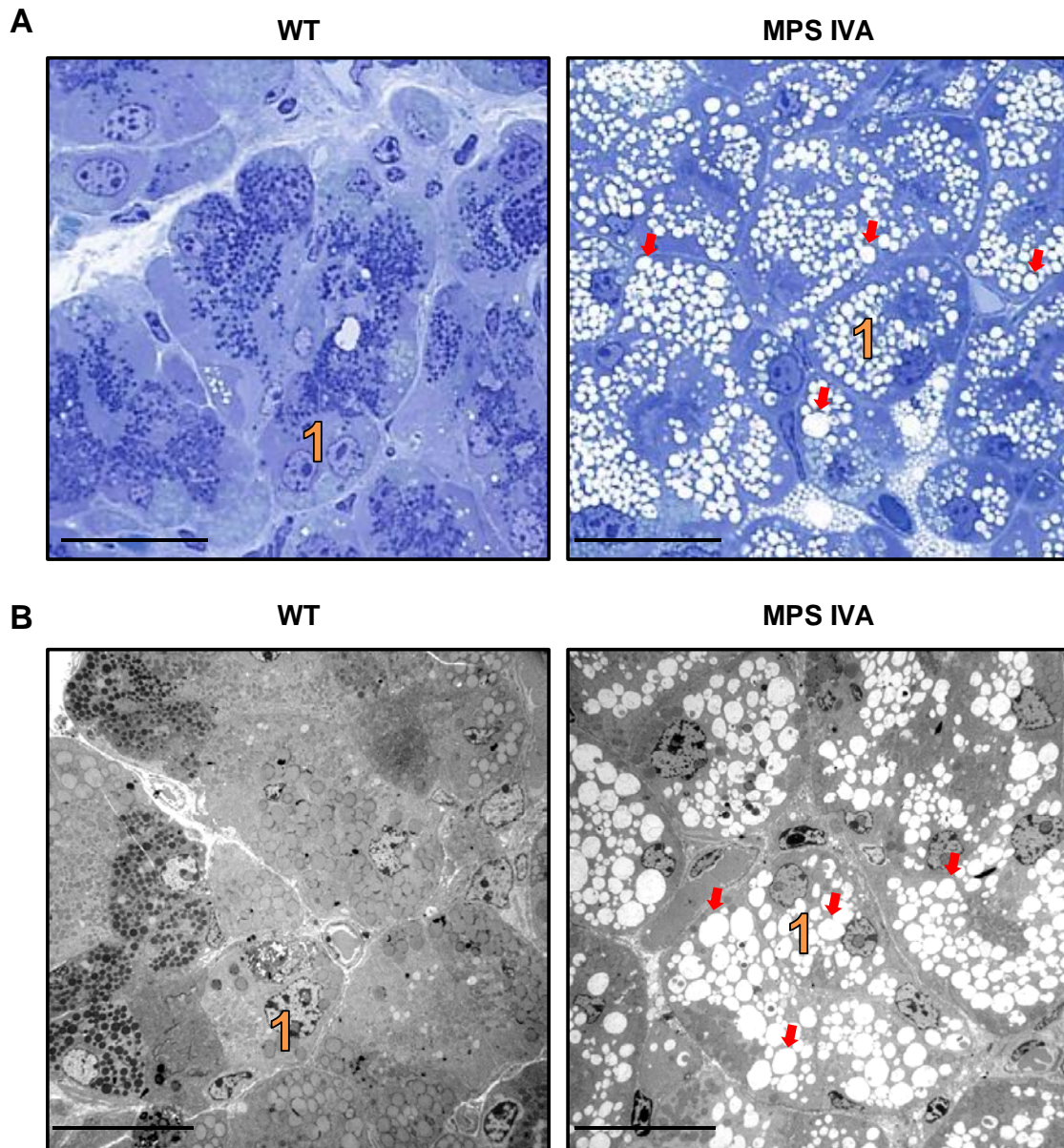


Figura 22. Evaluación de la alteración morfológica de la glándula lagrimal de ratones MPS IVA. (A) Tinción con *toluidine blue* en cortes histológicos de glándulas lagrimales y (B) análisis ultraestructural de los alvéolos lagrimales de ratones machos WT y MPS IVA de 4 meses de edad. En estos análisis se observó un elevado contenido de vesículas de acumulación de material poco electrodenso (flechas) en los animales MPS IVA. Imágenes representativas de 3-5 animales por grupo. La barra de escala indica 20 μm . 1: Alveolo lagrimal.

2.4. Patología del sistema nervioso central

Tras el evento de recombinación homóloga llevado a cabo en las mESC y dado que el vector de recombinación utilizado para disrumpir la expresión de *Galns* presentaba el gen LacZ, este gen quedó bajo el control del promotor endógeno de *Galns* (Figura 12A). Esto permitió extrapolar que la expresión de LacZ que se observaba en el ratón MPS IVA era directamente relacionable a la expresión de *Galns* en un ratón WT.

El análisis de expresión de LacZ, se llevó a cabo un estudio *in toto* en el que se expusieron cerebros de ratones MPS IVA al sustrato X-gal, el cual es procesado por la enzima β -Galactosidasa, codificada por el gen LacZ, dando lugar a una coloración azul en las zonas de expresión de esta proteína (Figura 23).

Con este análisis se observó que LacZ y por lo tanto, *Galns* se expresaba en regiones del cerebro involucradas en las respuestas emocionales, como la amígdala (Amunts et al., 2005). También se observó expresión de *Galns* en regiones involucradas en procesos de estrés, ansiedad y depresión, como es el giro dentado (Boldrini et al., 2013). La afectación de estas regiones podría explicar la mayor incidencia de estos pacientes a sufrir ansiedad y depresión, entre otras alteraciones del comportamiento (Davison et al., 2013). Además, se observó la expresión de *Galns* en la mayor parte del córtex cerebral. Se ha descrito que alteraciones en esta región y en la amígdala dan lugar a desinhibición (Capitão et al., 2011; Jawaid et al., 2008), una característica del comportamiento observada en muchos pacientes de Morquio A (Davison et al., 2013).

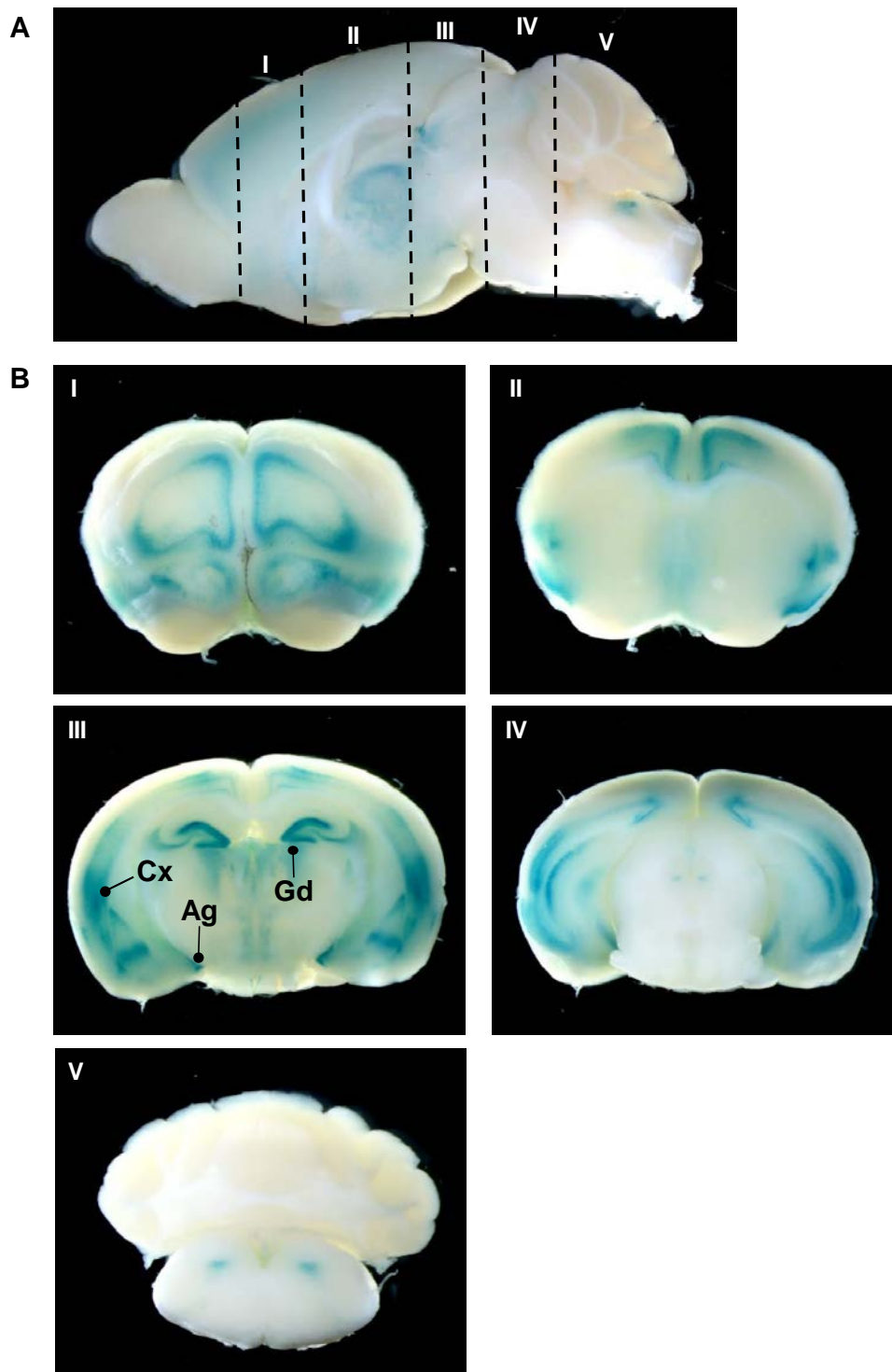


Figura 23. Localización, mediante expresión del gen LacZ, de la expresión génica de *Galns* en el encéfalo. Análisis de la expresión de *LacZ* en (A) corte sagital del encéfalo y en (B) distintos cortes coronales del encéfalo de ratones machos MPS IVA de 2 meses de edad mediante tinción *in toto* con solución X-gal. I-V: cortes coronales del encéfalo, de más frontal a más caudal. Cx: Córtex cerebral Ag: Amígdala. Gd: Giro dentado.

A continuación, se determinó la actividad GALNS en las regiones II y III del cerebro (regiones en las que se encuentran, además de una parte importante del córtex, la amígdala y el giro dentado) (Figura 23). Al igual que en el resto de tejidos analizados, en ambas regiones del cerebro se observó que la actividad GALNS era prácticamente indetectable en ratones MPS IVA (Figura 24A). De acuerdo con la falta de actividad en estas regiones, se observaron grandes acúmulos de QS tanto en la región II como en la región III del cerebro de ratones MPS IVA (Figura 24B).

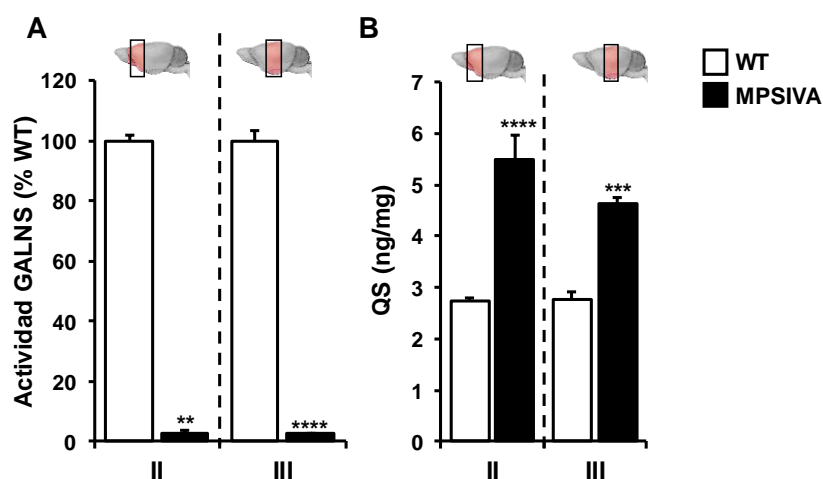




Figura 24. Determinación de actividad GALNS y cuantificación de queratán sulfato en el cerebro (A) Determinación de la actividad GALNS y **(B)** cuantificación de los niveles de QS en las regiones II y III de cerebros de ratones machos WT y MPS IVA de 7 meses de edad. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. Un esquema de las secciones coronales de cerebro (II-III) usadas para el análisis se muestra en la parte superior de la gráfica. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs WT.

Al igual que se observó en los otros tejidos, la falta de actividad GALNS en el cerebro no provocaba un incremento en los niveles de C6S ni en la región II ni en la región III del cerebro de ratones MPS IVA en comparación con ratones WT. Además, se volvió a evidenciar la baja proporción de este GAG en relación con los niveles de C4S que se detectaron en el cerebro de ratones tanto WT como MPS IVA (Tabla 15).

Posteriormente, dado el incremento en el contenido de QS en las regiones II y III del cerebro, se evaluó la posible afectación que podía derivarse de la pérdida de la expresión de *Galns* en la amígdala y el giro dentado mediante ultraestructura por MET en cortes de cerebro de ratones MPS IVA y WT. Este estudio demostró, en ratones MPS IVA de 4 meses de edad, la presencia de grandes acúmulos de GAGs en las células gliales perineuronales y en las células endoteliales de la amígdala (Figura 25), y en macrófagos perineuronales y células endoteliales del giro dentado (Figura 26). En ninguna de las regiones analizadas por microscopía electrónica se observó acúmulo de GAGs en las neuronas.

Tabla 15. Cuantificación de la concentración de Condroitín Sulfato en el cerebro.

		Condroitín Sulfato (ng/mg)		
		WT	MPS IVA	
	II	C4S	186.76 ± 6.67	196.64 ± 7.07
		C6S	5.15 ± 0.47	6.09 ± 1.13
		C4S/C6S	37.23 ± 3.09	34.60 ± 6.32
	III	C4S	199.08 ± 6.63	199.46 ± 14.20
		C6S	5.07 ± 0.12	5.38 ± 0.72
		C4S/C6S	39.29 ± 1.39	37.75 ± 2.59

Los datos que se muestran corresponden a la media ± SEM de 5 animales por grupo. Un esquema de las secciones coronales de cerebro (II-III) usadas para el análisis se muestra en la parte izquierda de la tabla. C4S: Condroitín 4-Sulfato, C6S: Condroitín 6-Sulfato.

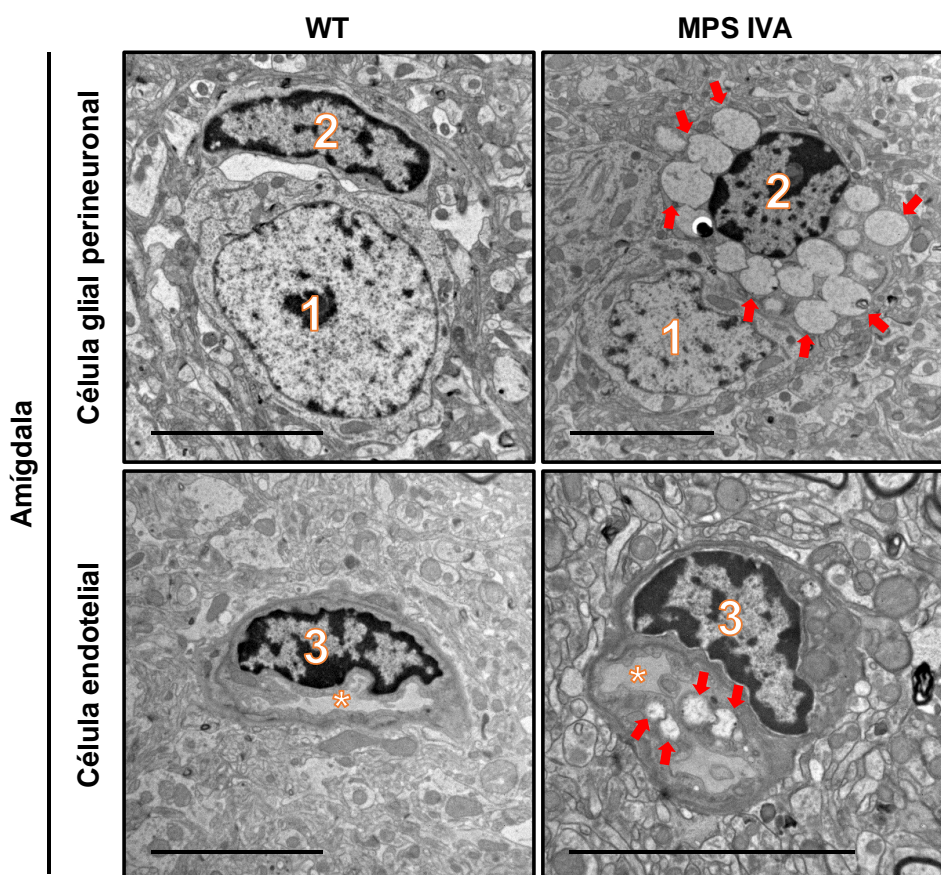


Figura 25. Análisis ultraestructural de la acumulación lisosomal en la amígdala de ratones MPS IVA. Imágenes representativas de imágenes de ultraestructura de la amígdala de ratones machos WT y MPS IVA de 4 meses de edad en los que se observan vesículas de acumulación de material poco electrodensito (flechas) en las células gliales perineuronales y en las células endoteliales. Imágenes representativas de 2-3 animales por grupo. (1: Neurona, 2: Célula glial perineuronal, 3: Célula endotelial, *: Luz vaso sanguíneo). La barra de escala indica 5 µm.

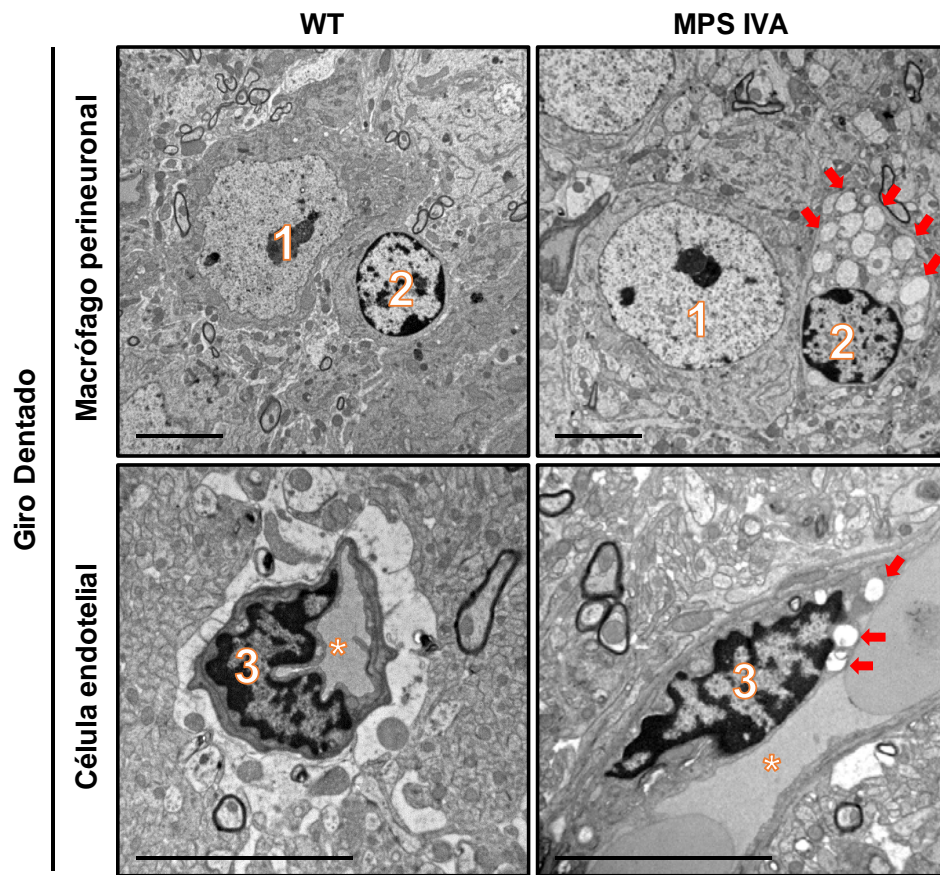


Figura 26. Análisis ultraestructural de la acumulación lisosomal en el giro dentado de ratones MPS IVA. Imágenes representativas de imágenes de ultraestructura del giro dentado de ratones machos WT y MPS IVA de 4 meses de edad en los que se observan vesículas de acumulación de material poco electrodenso (flechas) en los macrófagos perineuronales y en las células endoteliales. Imágenes representativas de 2-3 animales por grupo. (1: Neurona, 2: Macrófago perineuronal, 3: Célula endotelial, *: Luz vaso sanguíneo). La barra de escala indica 5 μm .

Estudios *post-mortem* en pacientes de Morquio A han descrito alteraciones en el córtex de estos pacientes (Koto et al., 1978). Por ello se analizó el córtex de ratones MPS IVA. La presencia de una posible neuroinflamación como consecuencia del acúmulo de QS (Figura 24B) se llevó a cabo mediante análisis inmunohistoquímico contra GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), una proteína estructural citoplasmática presente en los astrocitos. La tinción inmunohistoquímica contra GFAP en cortes histológicos de cerebros de ratones WT y MPS IVA de 7 meses de edad evidenció una marcada astrocitosis en diversas regiones del córtex cerebral de ratones MPS IVA (Figura 27A, B).

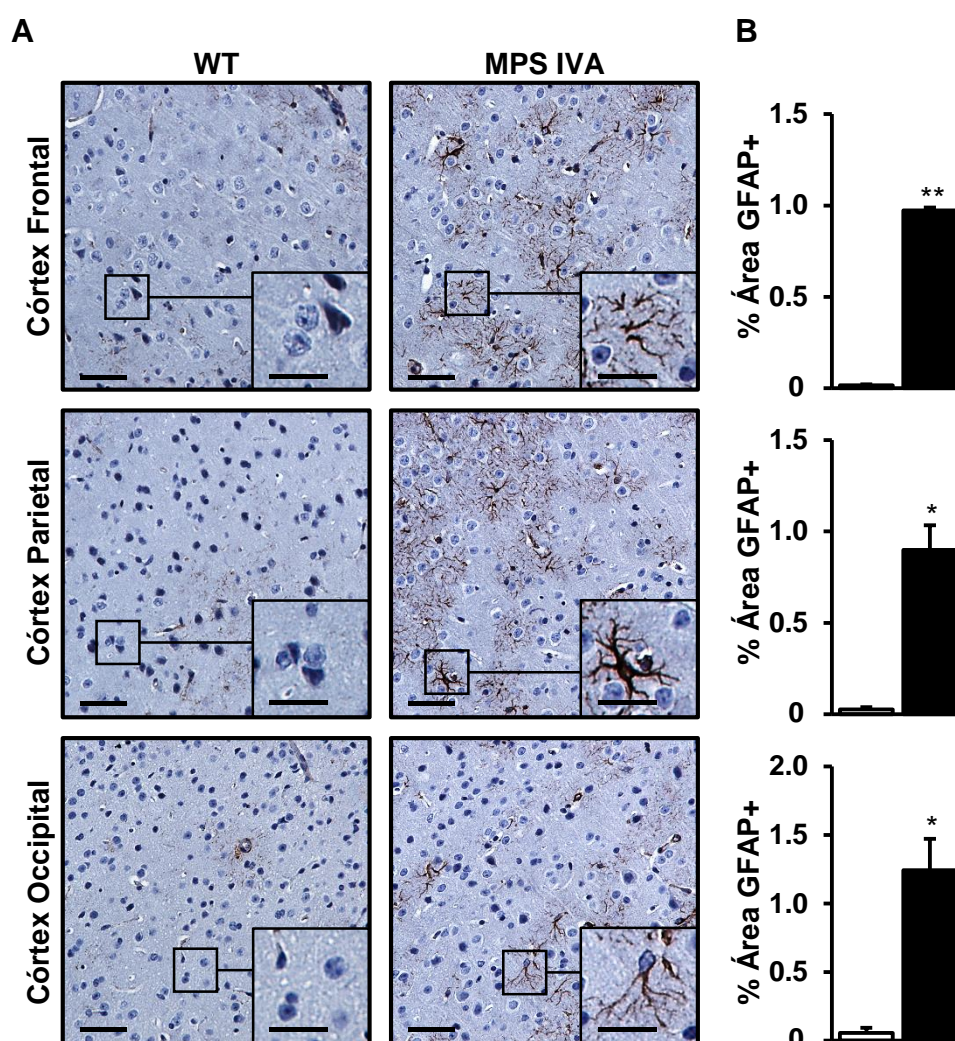


Figura 27. Evaluación de la neuroinflamación en ratones MPS IVA de 7 meses de edad. (A) Imágenes representativas de cortes histológicos de córtex tras el análisis inmunohistoquímico con un anticuerpo específico para GFAP y (B) cuantificación del marcaje contra GFAP en diferentes zonas del córtex cerebral de ratones machos de 7 meses de edad. El análisis inmunohistoquímico puso de manifiesto la presencia de una marcada astrocitosis en la corteza cerebral de ratones MPS IVA. Imágenes representativas de 4 animales por grupo. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 4 animales por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs WT. La barra de escala indica 50 μ m (25 μ m *inset*).

2.5. Supervivencia del modelo murino MPS IVA

Una vez caracterizadas las alteraciones fenotípicas en los diferentes tejidos y órganos del modelo murino MPS IVA, se evaluó si estas alteraciones podrían disminuir la esperanza de vida de este modelo, en comparación con ratones WT. El estudio de supervivencia se analizó utilizando el estimador de *Kaplan-Meier*.

Este estudio evidenció que la patología observada en el ratón MPS IVA no acortaba la esperanza de vida de este modelo en comparación con animales sanos (WT) y con animales heterocigotos (Het) para la disrupción del gen *Galns* (Figura 28). La vida media de todos los ratones era aproximadamente de 27 meses.

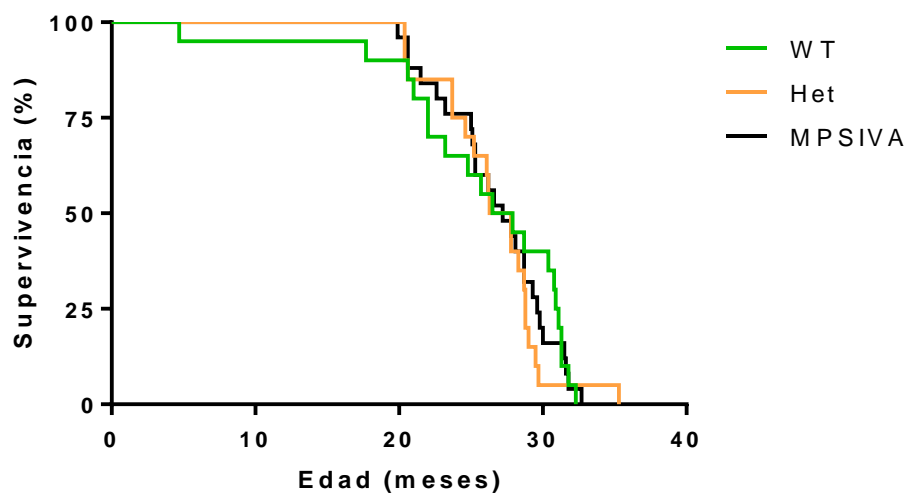


Figura 28. Supervivencia del modelo murino MPS IVA. Representación de *Kaplan-Meier* mostrando las curvas de supervivencia de ratones machos WT, Het y MPS IVA. Los datos que se muestran corresponden a la supervivencia de 20 animales por grupo. Supervivencias medianas en meses para WT: 27,2; Het: 27,05 y MPS IVA: 27,2.

***Parte 2. Estudio de la distribución de vectores
AAV-GFP tras una administración
intravenosa***

1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS VECTORES VIRALES AAV8 Y AAV9 ADMINISTRADOS POR VIA INTRAVENOSA PARA TRANSDUCIR LOS PRINCIPALES TEJIDOS AFECTADOS EN LA ENFERMEDAD DE MORQUIO A

La enfermedad de Morquio A se caracteriza por una marcada patología esquelética y diversas alteraciones a nivel somático. Por este motivo y previo al diseño de una aproximación de terapia génica, se llevó a cabo un análisis de biodistribución de vectores AAV8 y AAV9, tanto en ratones WT como en ratones MPS IVA. Este estudio tuvo como finalidad determinar el vector con mayor capacidad de transducción de los tejidos más afectados en esta enfermedad, como son los huesos y otros tejidos somáticos claves, entre los que se encuentran la tráquea y el corazón (Montaño et al., 2007). Estos vectores utilizados codificaban para el gen marcador de la proteína verde fluorescente o GFP (*Green Fluorescent Protein*), bajo el control del promotor ubicuo CAG.

La vía escogida para la administración de estos vectores fue la intravenosa, ya que ésta probablemente permitiría llegar a un gran número de tejidos periféricos, donde se encuentran las principales alteraciones de los pacientes de Morquio A.

Este estudio permitió determinar si los vectores AAV8 o AAV9 eran capaces de transducir los principales tejidos afectados en la enfermedad de Morquio. Esta transducción permitiría la restauración de la expresión de *Galns* en la mayoría de los tejidos afectados. Además, la administración intravenosa garantizaba una elevada transducción del hígado, tanto en el caso de utilizar vectores AAV8 como AAV9 (Sands, 2011), como del tejido adiposo (Jimenez et al., 2013). Así, tanto el hígado como el tejido adiposo podrían actuar como órgano de secreción de proteínas lisosomales dando lugar a una importante fuente de enzima circulante y, consecuentemente, a la corrección de la patología lisosomal en tejidos somáticos no transducidos, por el mecanismo de corrección cruzada (Figura 2) (Ruzo et al., 2012b, 2012a; Tessitore et al., 2007).

El estudio de biodistribución se llevó a cabo en ratones sanos (*Wild-type*, WT) y homocigotos para la disrupción del gen *Galns* (MPS IVA) de 8 semanas de edad, descritos en la parte 1 de este trabajo. Se realizó un estudio dosis-respuesta y ambos vectores se administraron a la dosis de 1×10^{11} vg/ratón y 1×10^{12} vg/ratón (Figura 29). Quince días tras la administración, los animales se eutanasiaron y se procedió a analizar la expresión de GFP en el fémur y la tibia a nivel histológico. Además, la expresión de GFP también se determinó mediante fluorimetría específica de GFP en diferentes huesos, tejidos somáticos y SNC.

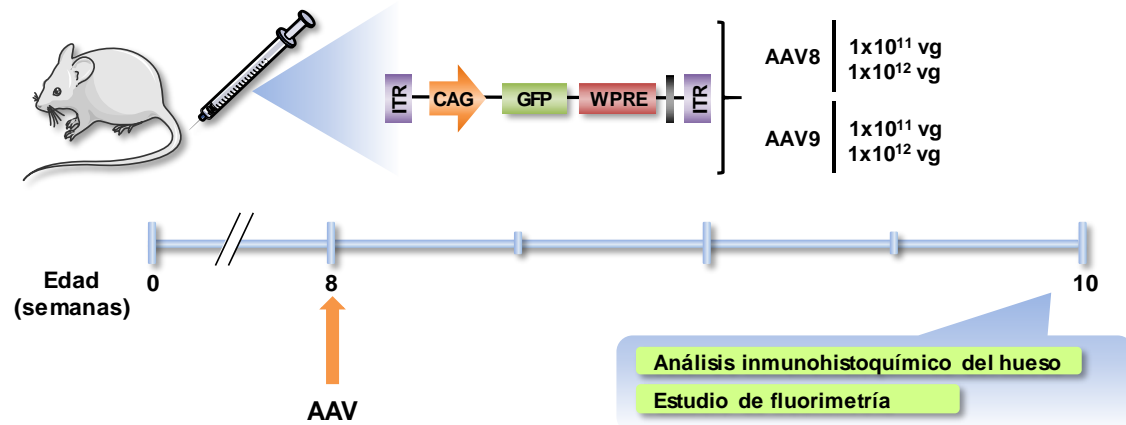


Figura 29. Diseño experimental del estudio de biodistribución. El vector viral AAV8-CAG-GFP-WPRE (AAV8-GFP) o AAV9-CAG-GFP-WPRE (AAV9-GFP) se administró por vía intravenosa en ratones WT y MPS IVA machos de 8 semanas de edad. Después de 2 semanas tras la administración, se llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico del hueso y el estudio de fluorimetría en diferentes órganos y tejidos.

1.1. Análisis inmunohistoquímico del hueso

Debido a la gran relevancia de la patología del hueso en la enfermedad de Morquio A, el principal interés de este estudio fue determinar la capacidad de los vectores AAV8 y AAV9 para transducir el sistema esquelético. Para ello, se realizó un análisis inmunohistoquímico contra GFP en cortes histológicos de fémur y tibia de ratones WT y MPS IVA tratados con el vector AAV-GFP. En este estudio se analizaron diferentes regiones de los huesos largos, incluyendo los extremos o epífisis, la metáfisis -región del hueso que alberga la placa de crecimiento y que en los huesos largos se encuentra situada entre las epífisis- y la zona central llamada diáfisis (Figura 30).

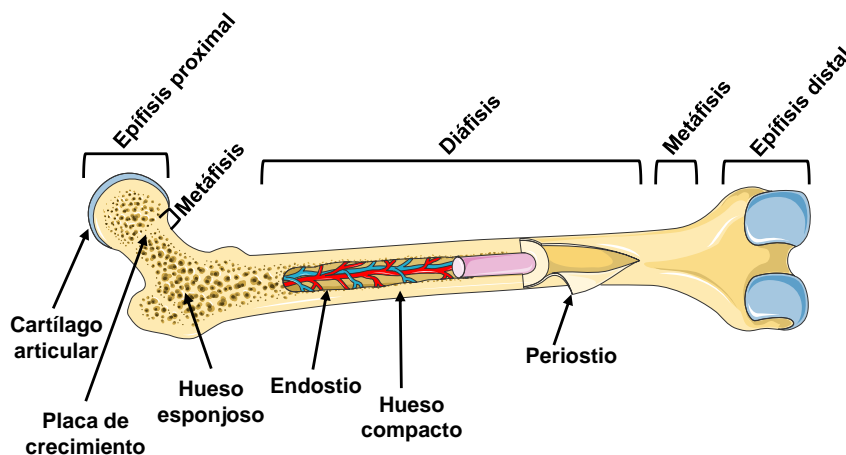


Figura 30. Representación esquemática de las diferentes regiones de un hueso largo

Los resultados obtenidos en este estudio han mostrado que la señal correspondiente a la detección del transgén era dependiente de dosis tanto en ratones administrados con AAV8-GFP como con AAV9-GFP. Además, se observó que, tanto en la tibia como en el fémur, la expresión del transgén era claramente detectable en la zona de la diáfisis más próxima a la placa de crecimiento y en el endostio, que constituye la membrana que recubre la superficie de la cavidad medular de los huesos largos separándola del hueso compacto, y en la que se encuentran células osteoprogenitoras. Estos resultados fueron evidentes tanto en animales WT como MPS IVA tratados con el vector AAV8 (Figura 31 y 32) o con el vector AAV9 (Figura 33 y 34).

Por el contrario, con ninguno de los vectores utilizados se detectó expresión del transgén en las metáfisis, donde se encuentra la placa de crecimiento (Figura 31-34). La ausencia de expresión del transgén en esta zona era un evento esperado ya que se trata de una región del hueso no vascularizada (Ballock and O'Keefe, 2003).

No se observaron diferencias significativas en los niveles de transducción ni en la localización de la expresión de GFP tanto en animales MPS IVA tratados con el vector AAV8-GFP (Figura 32) como con el vector AAV9-GFP (Figura 34). De la misma manera, en los animales WT no se observaron diferencias de transducción o de expresión de GFP con ninguno de los vectores utilizados (Figura 31 y 33).

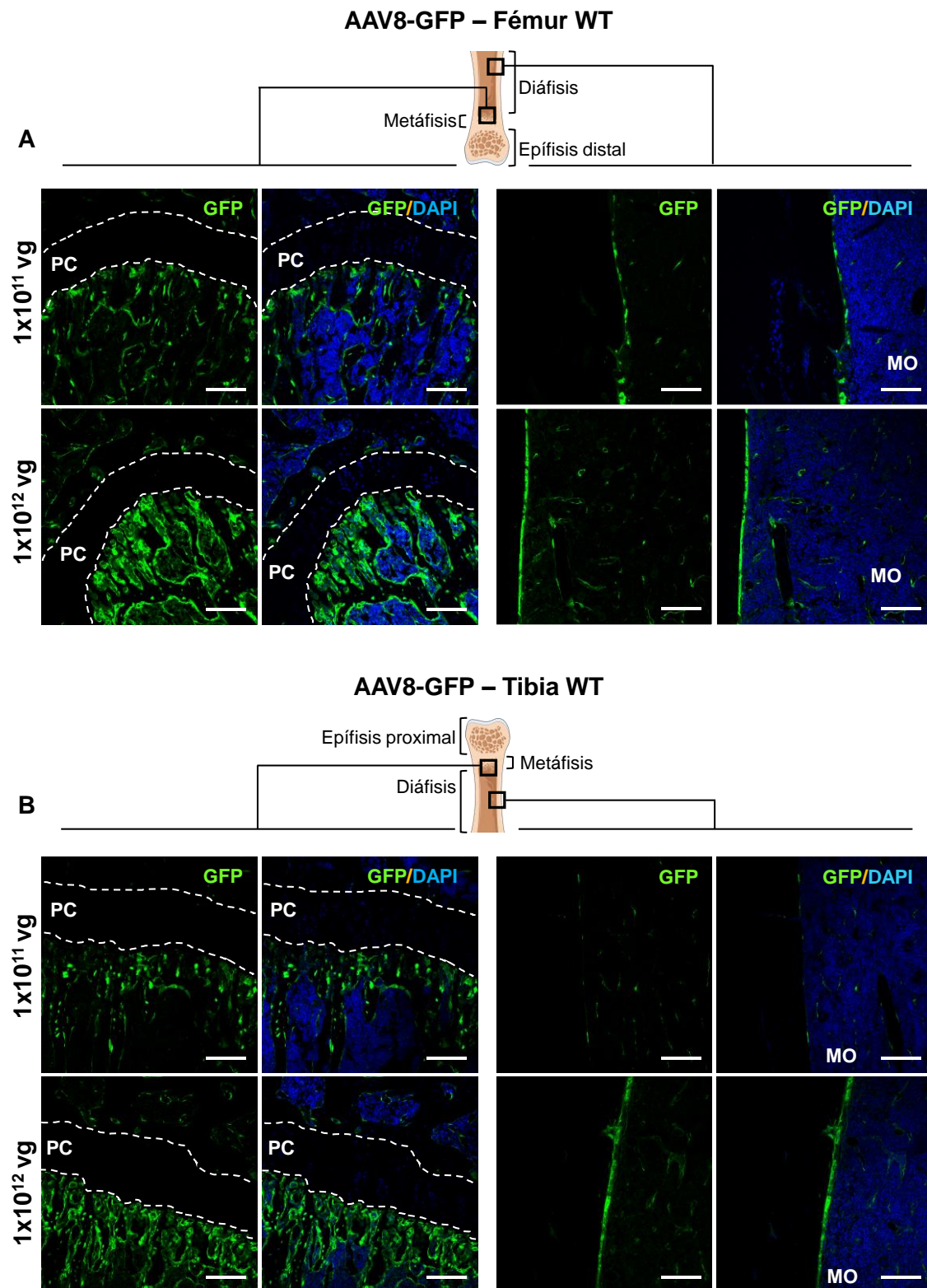


Figura 31. Expresión de GFP en el fémur y la tibia de ratones WT después de la administración intravenosa del vector AAV8-GFP. Análisis de expresión del transgén mediante inmunohistoquímica contra GFP en la región de la diáfisis más próxima a la metáfisis y en la región central de la diáfisis de **(A)** fémur y **(B)** tibia de ratones machos WT inyectados con el vector AAV8-GFP a las dosis de 1×10^{11} vg/animal y 1×10^{12} vg/animal. PC: Placa de crecimiento, MO: Médula ósea. La barra de escala indica 60 μ m.

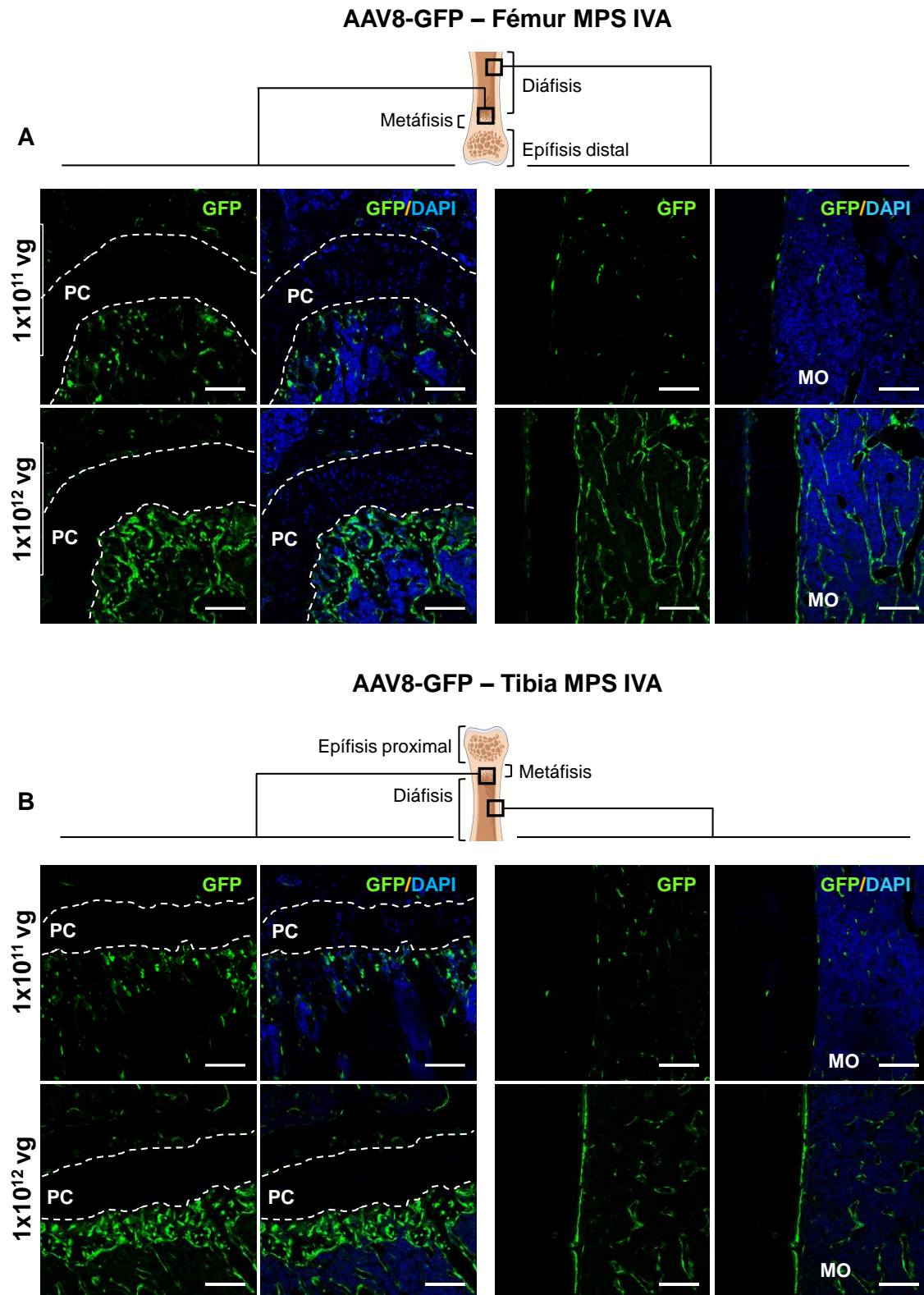


Figura 32. Expresión de GFP en el fémur y la tibia de ratones MPS IVA después de la administración intravenosa del vector AAV8-GFP. Análisis de expresión del transgén mediante inmunohistoquímica contra GFP en la región de la diáfisis más próxima a la metáfisis y en la región central de la diáfisis de **(A)** fémur y **(B)** tibia de ratones machos MPS IVA inyectados con el vector AAV8-GFP a las dosis de 1×10^{11} vg/animal y 1×10^{12} vg/animal. PC: Placa de crecimiento, MO: Médula ósea. La barra de escala indica 60 μ m.

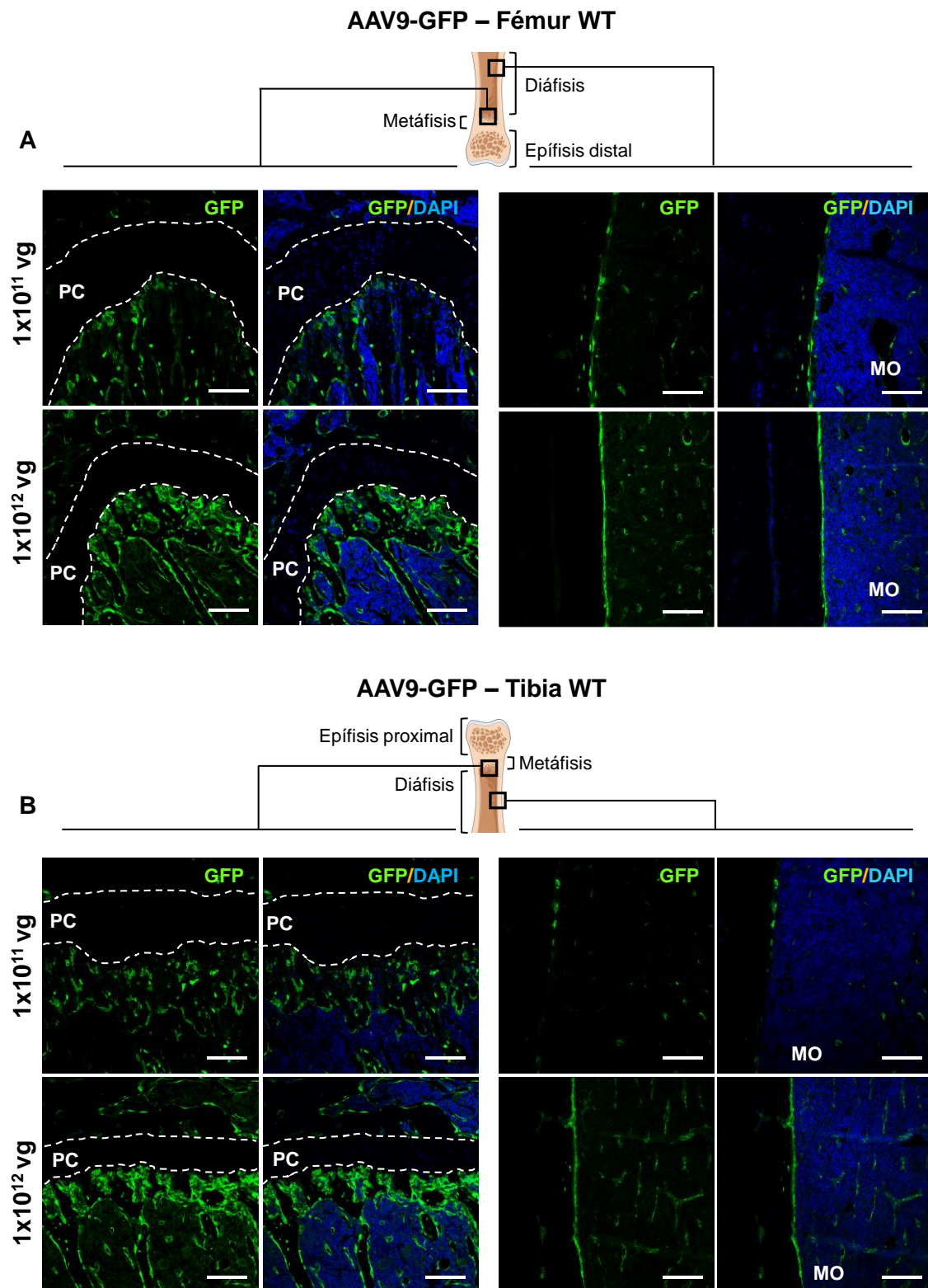


Figura 33. Expresión de GFP en el fémur y la tibia de ratones WT después de la administración intravenosa del vector AAV9-GFP. Análisis de expresión del transgén mediante inmunohistoquímica contra GFP en la región de la diáfisis más próxima a la metáfisis y en la región central de la diáfisis de **(A)** fémur y **(B)** tibia de ratones machos WT inyectados con el vector AAV9-GFP a las dosis de 1×10^{11} vg/animal y 1×10^{12} vg/animal. PC: Placa de crecimiento, MO: Médula ósea. La barra de escala indica 60 μ m.

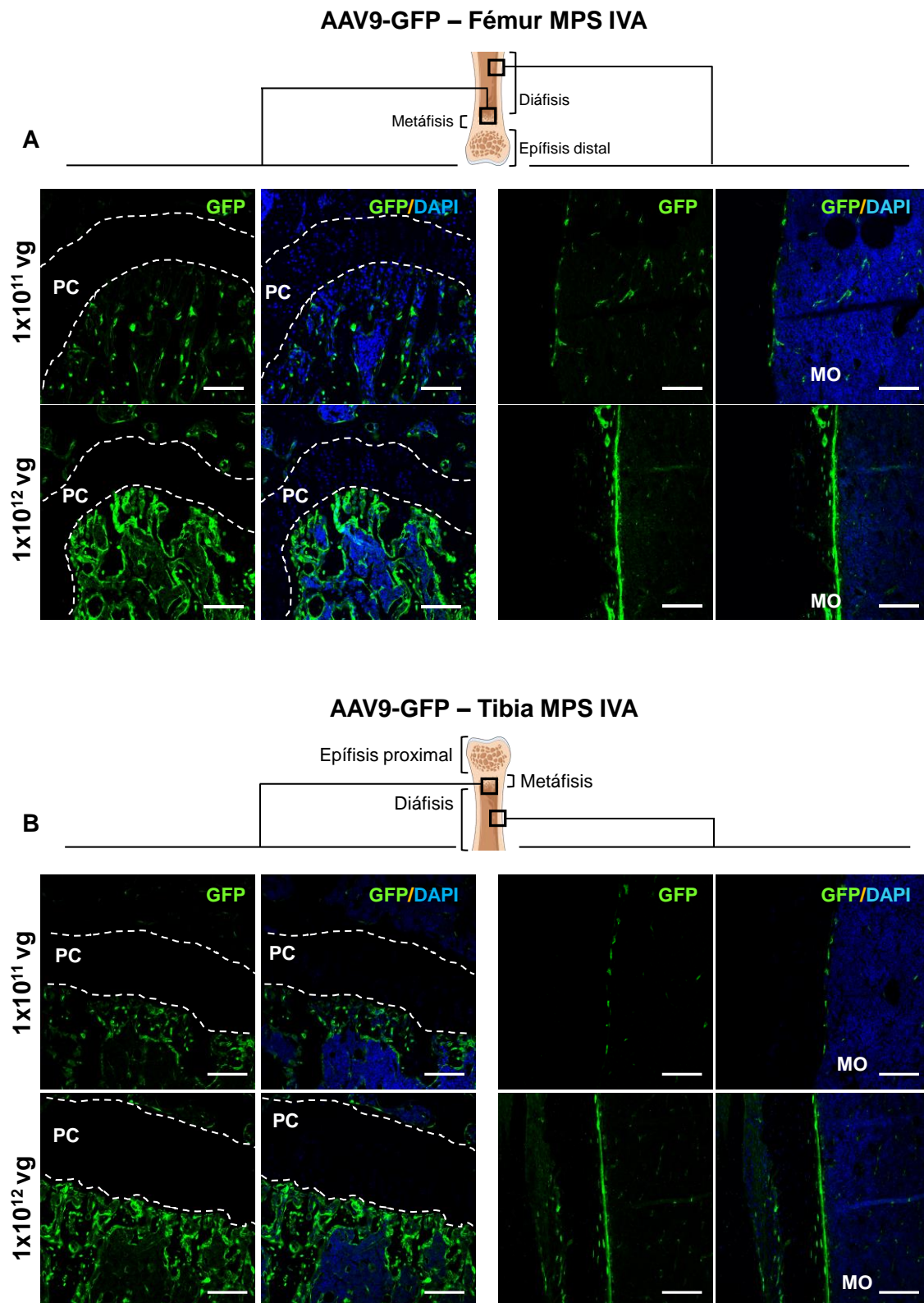


Figura 34. Expresión de GFP en el fémur y la tibia de ratones MPS IVA después de la administración intravenosa del vector AAV9-GFP. Análisis de expresión del transgén mediante inmunohistoquímica contra GFP en la región de la diáfisis más próxima a la metáfisis y en la región central de la diáfisis de **(A)** fémur y **(B)** tibia de ratones machos MPS IVA inyectados con el vector AAV9-GFP a las dosis de 1×10^{11} vg/animal y 1×10^{12} vg/animal. PC: Placa de crecimiento, MO: Médula ósea. La barra de escala indica 80 μm .

En la zona de la diáfisis más próxima a la metáfisis, se observó que la expresión del transgén se detectaba de forma homogénea a lo largo de toda la base de la placa de crecimiento (Figura 35).

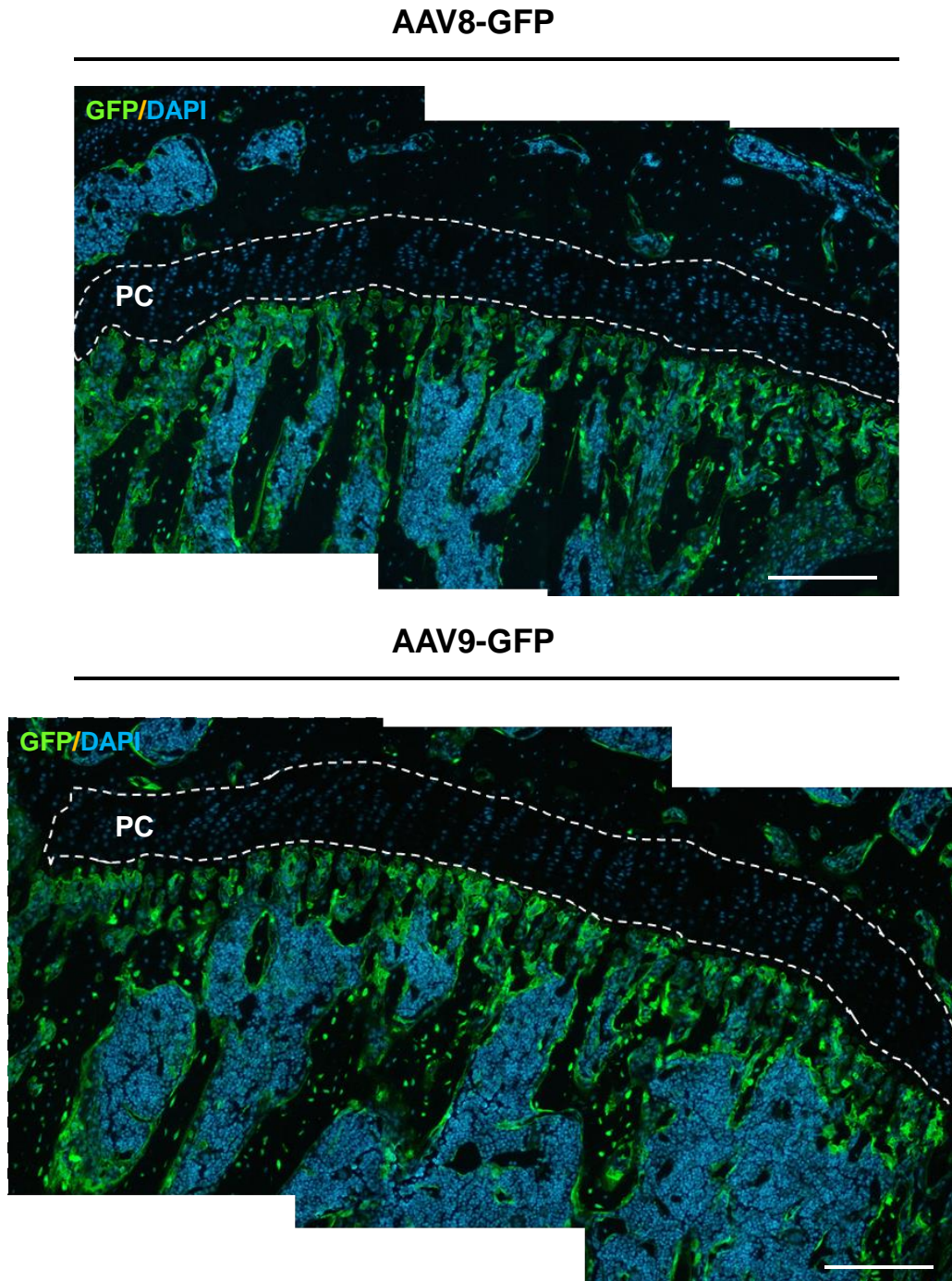


Figura 35. Expresión de GFP en la zona de la diáfisis en contacto con la metáfisis en animales MPS IVA. Superposiciones de diferentes imágenes de la tibia para reconstruir la zona de la diáfisis más próxima a la placa de crecimiento de animales MPS IVA inyectados con los vectores AAV8-GFP y AAV9-GFP a la dosis de 1×10^{12} vg/animal. Se observó una completa homogeneidad en la transducción de esta región del hueso con ambos vectores. PC: Placa de crecimiento. La barra de escala indica 200 μ m.

La zona de la diáfisis más próxima a la placa de crecimiento y el endostio constituyen regiones muy ricas en osteoblastos (Morrison and Scadden, 2014; Shapiro and Forriol, 2005). La localización de las células transducidas en el hueso junto con el aspecto celular parecía indicar que estas células fuesen osteoblastos. Además, la falta de marca fluorescente en células multinucleadas descartaba la posibilidad de que fuesen osteoclastos. Para comprobarlo, a continuación, se realizó un estudio de colocalización mediante el análisis inmunohistoquímico doble contra el gen marcador GFP y el marcador específico de osteoblastos, Osteocalcina (Figura 36). El análisis de colocalización de señal fluorescente de las diversas regiones de la tibia demostró que parte de las células transducidas eran osteoblastos.

Por lo tanto, este estudio demostró la capacidad, tanto del vector AAV8 como del AAV9 para transducir diferentes tipos celulares del hueso tras una administración intravenosa. Además, se observó que la transducción con dichos vectores no se veía alterada por las posibles alteraciones a nivel celular asociadas a la MPS IVA.

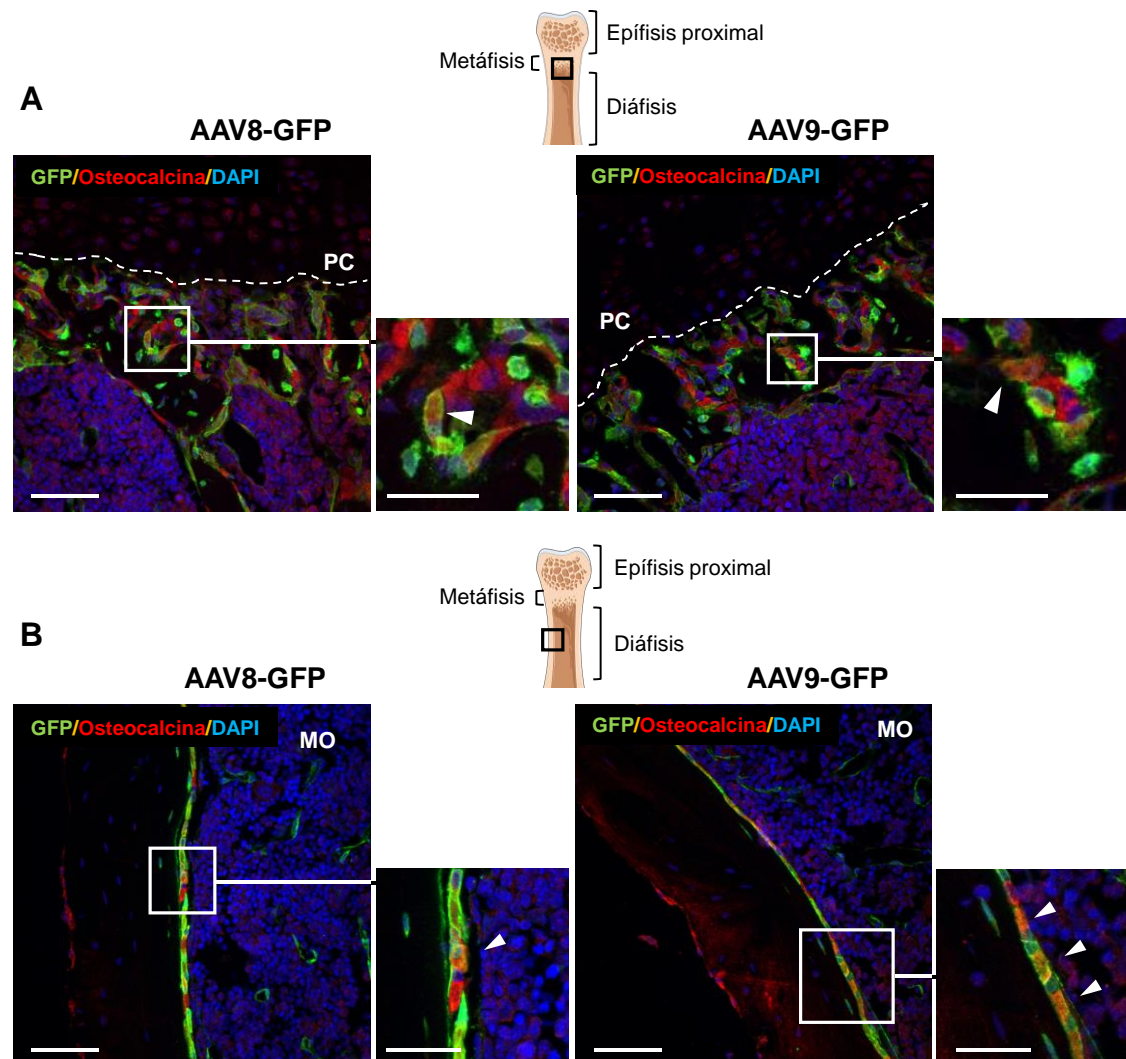


Figura 36. Transducción eficiente de los osteoblastos después de la administración intravenosa de los vectores AAV8 y AAV9. Inmunohistoquímica doble utilizando el marcador GFP (verde) y el marcador específico Osteocalcina (rojo) para determinar su colocalización en **(A)** la región de la diáfisis más próxima a la placa de crecimiento y **(B)** endostio de la tibia de ratones MPS IVA que recibieron una administración intravenosa de AAV8-GFP o AAV9-GFP a la dosis de 1×10^{12} vg/animal. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Los triángulos blancos indican las células dobles positivas. La barra de escala indica 60 μm (30 μm inset).

1.2. Análisis de expresión del transgén

El análisis de expresión de GFP en ratones WT y MPS IVA también se realizó mediante el análisis de la fluorescencia específica para esta proteína marcadora en diferentes tejidos.

En este estudio se observaron elevados niveles de fluorescencia específica de GFP tanto en el hígado de ratones WT como en el de ratones MPS IVA inyectados con el

vector AAV8-GFP o AAV9-GFP (Figura 37A, B), ya que éste es el principal órgano transducido por vectores AAV8 y AAV9 tras una administración sistémica (Sands, 2011).

Además, se observó que tanto la administración sistémica del vector AAV8-GFP como del vector AAV9-GFP daba lugar a elevados niveles de fluorescencia en diferentes tejidos esqueléticos como el fémur, extremidad anterior, esternón, costillas y vértebras de la región cervical y torácica (Figura 37A, B), siendo éstos algunos de los huesos más afectados en pacientes de Morquio A (Montaño et al., 2007).

Otros tejidos con una mayor emisión de fluorescencia específica de GFP fueron el corazón, la tráquea y el pulmón, órganos en los que se observan serias patologías en la enfermedad de Morquio A (Montaño et al., 2007) (Figura 37A, B).

En el sistema nervioso central se evidenció una baja emisión de fluorescencia, tanto en la médula espinal como en el cerebro de ratones inyectados con AAV8-GFP (Figura 37A), Sin embargo, este estudio también permitió evidenciar que la administración sistémica del vector AAV9-GFP era capaz de proporcionar niveles de transducción del SNC mucho más elevados que los observados con el vector AAV8-GFP (Figura 37B).

Un dato importante fue la elevada emisión de fluorescencia obtenida en el tejido adiposo de ratones WT y MPS IVA inyectados tanto con el vector AAV8-GFP como con el vector AAV9-GFP (Figura 37A, B), que estaban de acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio (Jimenez et al., 2013).

En todos los tejidos analizados se observó que la expresión de GFP era dependiente de dosis (Figura 37A, B). Nuevamente, no se observaron diferencias significativas de biodistribución entre ratones WT y MPS IVA ni con el vector AAV8-GFP ni con el vector AAV9-GFP, indicando que la transducción con dichos vectores no se modificaba por las posibles alteraciones a nivel celular asociadas a la MPS IVA.

Este estudio ha permitido observar una eficaz transducción de los principales tejidos (especialmente tejido óseo) y órganos afectados en pacientes de Morquio A, tanto con el vector AAV8 como con el vector AAV9. Además, el análisis del cerebro del ratón MPS IVA sugirió que un déficit de la expresión de *Galns* en este órgano podría provocar alteraciones a nivel del SNC en los pacientes de Morquio A. Estos dos estudios fueron determinantes en la elección del vector AAV9 para el desarrollo de una aproximación de terapia génica para Morquio A, debido a su demostrada eficacia para transducir el sistema esquelético y a su capacidad para cruzar la BHE en ratones inyectados de forma intravenosa (Bevan et al., 2011; Duque et al., 2009; Ruzo et al., 2012b).

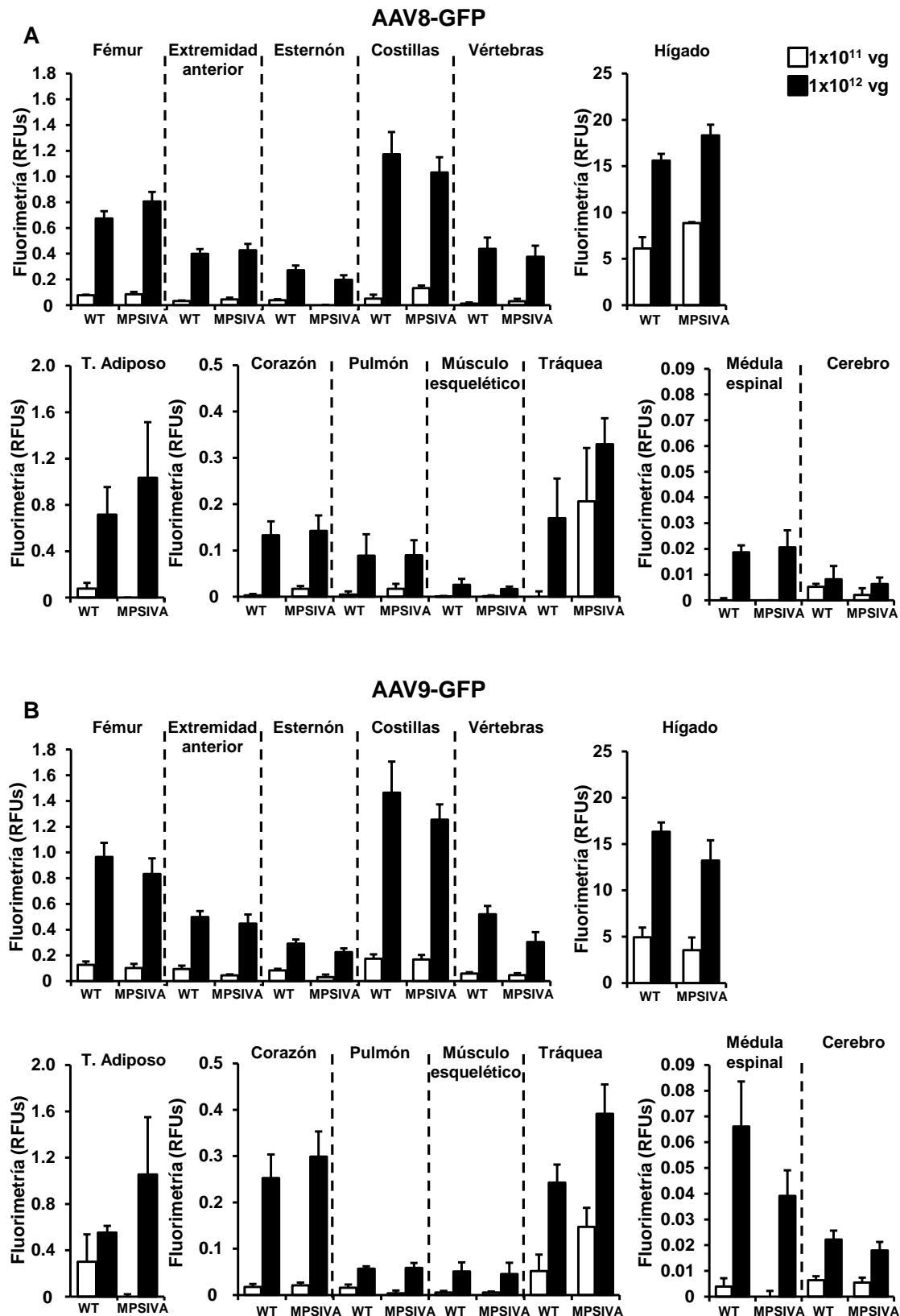


Figura 37. Determinación de la fluorescencia específica de GFP en diferentes tejidos. Cuantificación mediante fluorimetría de las RFUs específicas de GFP en diferentes tejidos de ratones machos sanos (WT) y ratones MPS IVA de 2 meses de edad inyectados con los vectores (A) AAV8-GFP y (B) AAV9-GFP a las dosis de 1×10^{11} vg/animal y 1×10^{12} vg/animal. Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 4-5 animales por grupo.

***Parte 3. Tratamiento del modelo animal murino
de MPS IVA con el vector AAV9***

1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR VIRAL ADENOASOCIADO DE SEROTIPO 9 CODIFICANTE PARA LA PROTEÍNA GALNS MURINA

Con el objetivo de tratar las diferentes patologías observadas en el ratón MPS IVA, se desarrolló una aproximación de terapia génica basada en la administración intravenosa de un vector AAV9 que transportaba una copia corregida de la secuencia codificante del gen *Galns* murino bajo el control del promotor ubicuo CAG (compuesto por el promotor de la β -actina de pollo y el *enhancer* del Citomegalovirus).

Para el diseño y construcción del vector viral se partió de la secuencia codificante del gen *Galns* murino (*Gene ID: 50917*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), la cual se optimizó con el fin de obtener un aumento en la eficiencia tanto a nivel de traducción del mRNA como también de la expresión de la proteína (Disbrow et al., 2003; Ward et al., 2011). La secuencia murina optimizada, *omGalns*, donde la *m* indica el origen murino y la *o* la optimización de la secuencia, se clonó en el plásmido de expresión pAAV-CAG, que contenía el promotor ubicuo CAG, la secuencia de poliadenilación de la β -globina de conejo y las ITRs del vector AAV2. El plásmido resultante se denominó pAAV-CAG-*omGALNS*.

La producción del vector viral se llevó a cabo mediante un sistema de triple transfección en células HEK293 y posterior purificación (ver Materiales y Métodos). El vector viral resultante se denominó AAV9-CAG-*omGALNS* (AAV9-GALNS) (Figura 38).



Figura 38. Representación esquemática del constructo codificante para la proteína GALNS murina optimizada. Se trata de un vector AAV9 que transporta el gen de la secuencia optimizada de *Galns* bajo el promotor ubicuo CAG. CAG: promotor híbrido compuesto por el promotor de la β -actina de pollo y el *enhancer* del Citomegalovirus. ITR: *Inverted Terminal Repeats*; *Poly A*: secuencia de poliadenilación de la β -globina de conejo.

2. INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD GALNS EN EL SISTEMA ESQUELÉTICO TRAS LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DEL VECTOR AAV9-GALNS

A pesar de que el ratón MPS IVA no presenta patología a nivel esquelético y dado que la aproximación de terapia génica desarrollada en este trabajo podría ser aplicada en pacientes de Morquio A, uno de los principales objetivos era garantizar la llegada de la proteína GALNS al interior del hueso.

Con el fin de determinar si esta aproximación de terapia génica era capaz de recuperar la expresión de *Galns* e incrementar su actividad enzimática en el hueso, se administró por vía intravenosa el vector viral AAV9-GALNS a una dosis de 1×10^{12} vg/ratón. La administración intravenosa se realizó en ratones MPS IVA machos jóvenes de 1 mes de edad. El grupo experimental también estaba formado por ratones WT hermanos de camada.

En este estudio se observó que transcurrido 1 mes tras la administración del vector AAV9-GALNS, se evidenciaba una recuperación de la expresión del gen *Galns* en las diferentes regiones de la tibia (Figura 39A). Además, se observó un incremento de la actividad GALNS en estas mismas regiones del fémur de ratones MPS IVA tratados (Figura 39B). Este incremento en los niveles de actividad alcanzó valores de entre 2,7 y 2 veces respecto los valores de actividad observados en las mismas regiones del fémur de ratones WT.

Este estudio demostró que la actividad GALNS observada en las diferentes regiones del fémur de ratones MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS puede proceder principalmente de la propia expresión de *Galns* en el hueso, así como también de la GALNS circulante que es captada por el fémur.

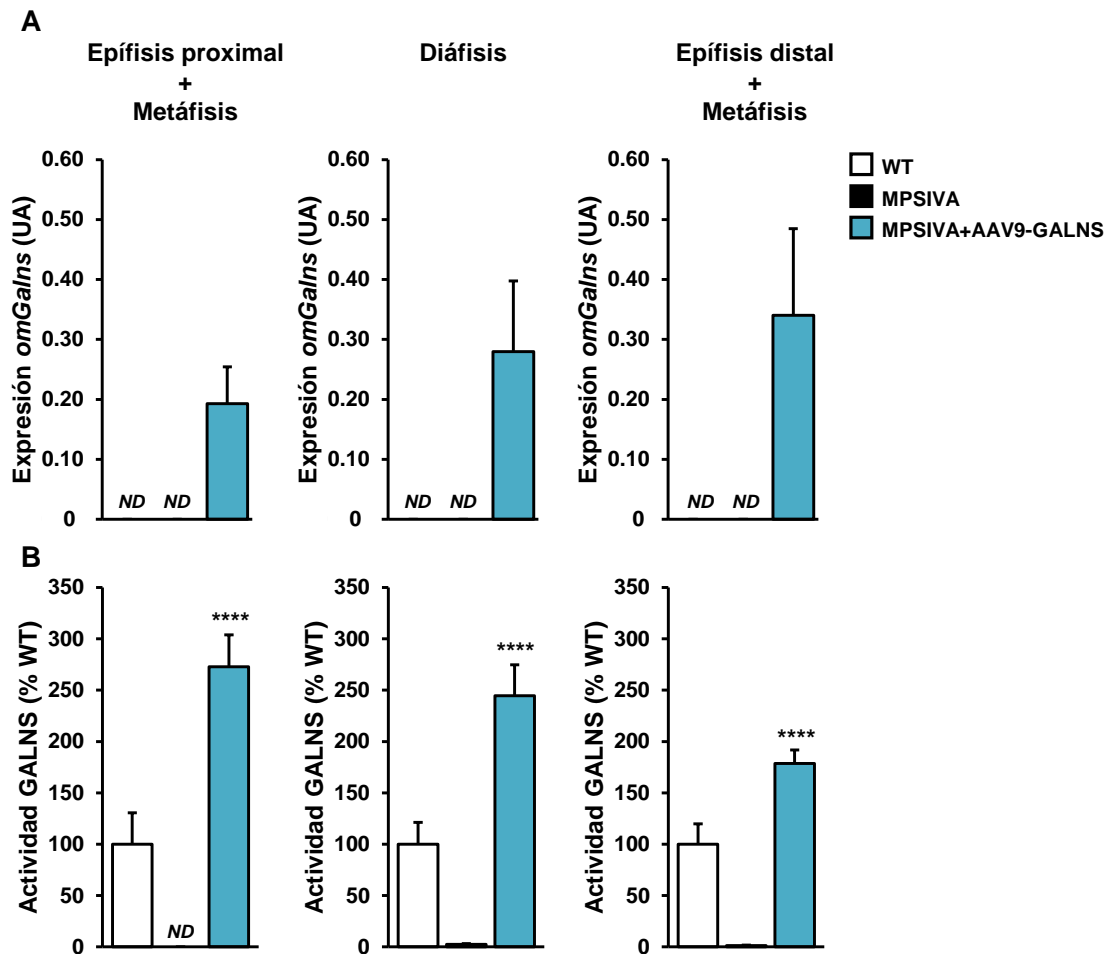


Figura 39. Análisis de expresión y actividad de GALNS en diferentes regiones de huesos largos. (A) Determinación de la expresión de la versión optimizada de *Galns* en la epífisis + metáfisis proximal, diáfisis y epífisis + metáfisis distal de la tibia de ratones sanos (WT), MPS IVA y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS. Únicamente se observó expresión de *Galns* optimizada en los animales MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS. **(B)** Actividad GALNS en extractos de fémur en la región de la epífisis + la metáfisis proximal, la diáfisis y la epífisis + la metáfisis distal de ratones sanos (WT), MPS IVA y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS. La actividad GALNS fue prácticamente indetectable en ratones MPS IVA, mientras que en los grupos tratados con AAV9-GALNS se observó un incremento significativo de actividad en todas las regiones analizadas. Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5-6 animales por grupo. **** $p < 0.0001$ vs MPS IVA. UA: Unidades Arbitrarias. ND: No detectable.

3. EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DEL VECTOR AAV9-CAG-omGALNS

Con el fin de determinar el posible efecto terapéutico de la administración sistémica del vector viral AAV9 codificante para la proteína GALNS murina sobre la patología observada en el modelo animal, el vector AAV9-GALNS fue administrado a una dosis de 1×10^{12} vg/ratón por vía intravenosa, a través de una de las venas caudales, en ratones MPS IVA machos de 1 mes de edad (Figura 40). Como animales control se utilizaron ratones MPS IVA administrados también por vía intravenosa y a la misma dosis con el vector AAV9-Null, que contiene el promotor CAG y la secuencia de poliadenilación, pero no el gen *Galns*, y por lo tanto, no codifica para ninguna proteína. El grupo experimental también lo formaron ratones sanos WT y MPS IVA no tratados.

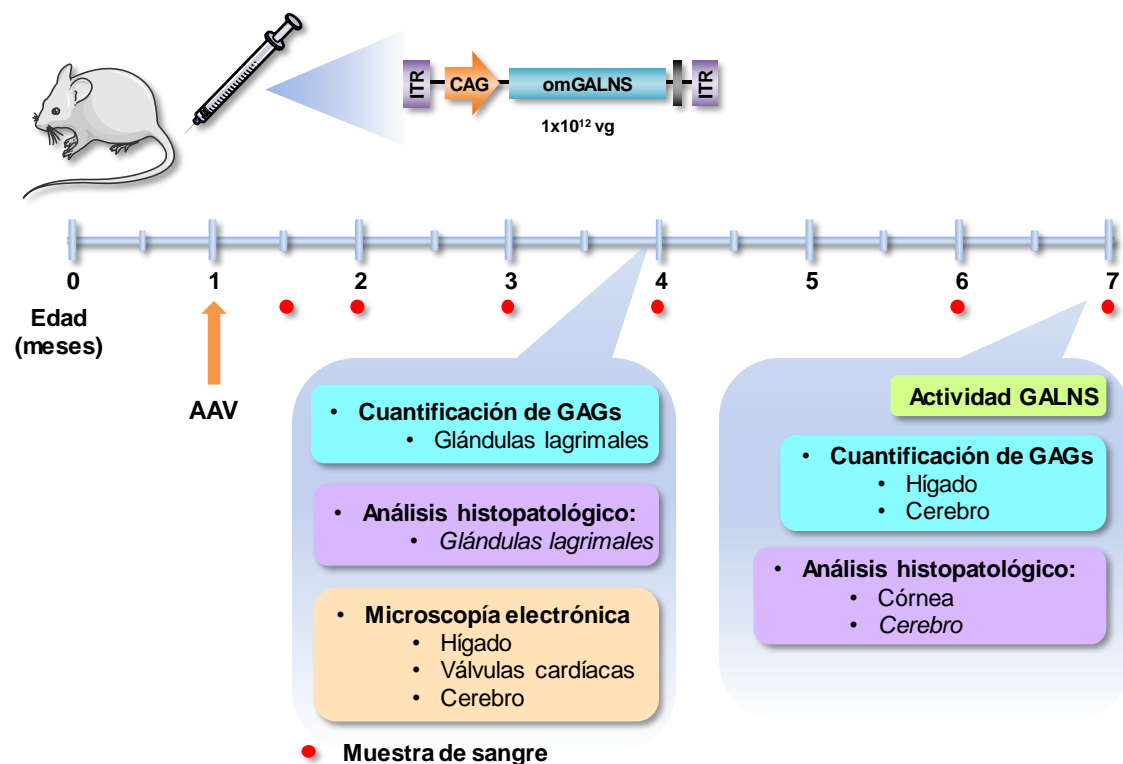


Figura 40. Diseño experimental. El vector viral AAV9-GALNS fue administrado vía intravenosa en ratones MPS IVA machos de 1 mes de edad. Paralelamente también se inyectó por vía intravenosa ratones MPS IVA con el vector AAV9-Null como control. El sacrificio se realizó 3 y 6 meses después de la administración viral, momento en el que se analizaron todos los parámetros que se indican en la figura.

Dado que la enfermedad de Morquio A es progresiva, se realizó un primer estudio en el que los animales tratados se analizaron a los 3 meses post-tratamiento y un segundo estudio en el que los animales tratados se analizaron a los 6 meses después de la administración del vector viral. En el análisis a los 3 meses post-tratamiento se

evaluó el contenido de GAGs y la distensión lisosomal mediante análisis histopatológicos, MET y LC-MS/MS. En el segundo análisis, a los 6 meses post-tratamiento, se evaluó la actividad GALNS, el contenido de GAGs, la opacidad corneal y la neuroinflamación mediante análisis histopatológicos y LC-MS/MS (Figura 40).

3.1. Incremento de la actividad GALNS y corrección del contenido de GAGs en tejidos somáticos

Con la finalidad de evaluar el efecto del tratamiento intravenoso con el vector viral AAV9-GALNS en ratones MPS IVA a nivel somático, se analizó la actividad GALNS y se cuantificó el contenido de QS de diferentes órganos y tejidos de ratones WT, MPS IVA, MPS IVA tratados con el vector Null (MPSIVA+AAV9-Null) y MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS (MPSIVA+AAV9-GALNS).

En primer lugar, se evaluó la actividad GALNS a nivel hepático, ya que tal y como se evidenció en el estudio de biodistribución, el hígado es el principal órgano transducido por el vector AAV9 cuando éste es administrado de forma sistémica. En este análisis se observó que el hígado de ratones MPS IVA no tratados o tratados con el vector AAV9-Null presentaba niveles prácticamente indetectables de actividad GALNS, mientras que los ratones MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS alcanzaba valores de actividad GALNS 25 veces superior a los valores de actividad enzimática obtenidos en ratones WT (Figura 41A). En respuesta a este incremento de actividad en el hígado, se observó una completa normalización de los niveles patológicos de QS hepáticos (Figura 41B).

De acuerdo con la normalización de QS en el hígado, se realizó un análisis ultraestructural mediante MET, donde se observó que las células *Kupffer* de ratones MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS presentaban una completa corrección del contenido en vesículas de acumulación (Figura 42).

Por lo tanto, este estudio demostró la capacidad de la terapia génica con AAV9-GALNS para revertir las alteraciones hepáticas en el ratón MPS IVA.

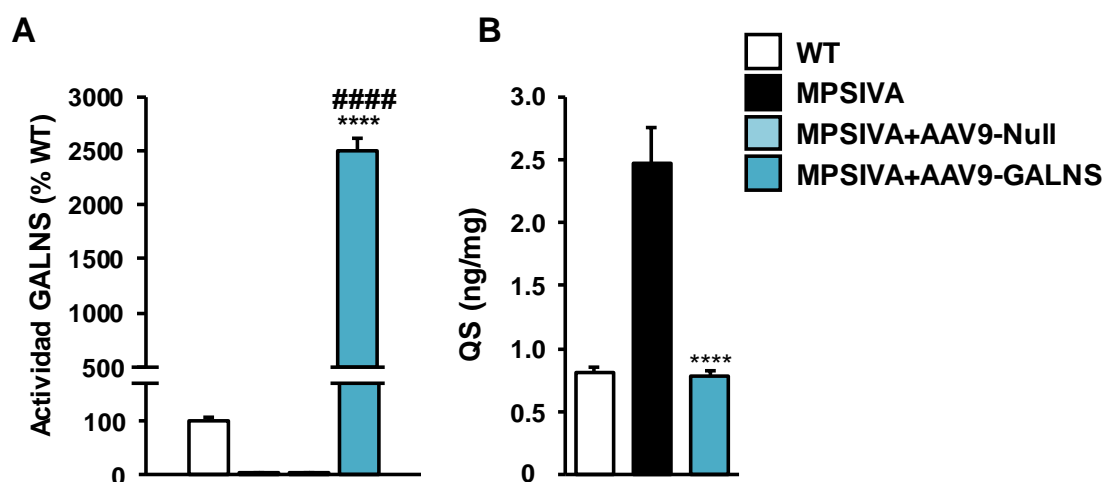


Figura 41. Incremento de actividad GALNS y normalización de los niveles de queratán sulfato en el hígado. (A) Determinación de actividad GALNS y (B) Cuantificación del contenido de QS en hígado de ratones machos WT, MPS IVA, y MPS IVA tratados de 7 meses de edad (después de 6 meses de tratamiento). Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. **** $p < 0.0001$ vs MPS IVA, #### $p < 0.001$ vs MPS IVA tratados con AAV9-Null.

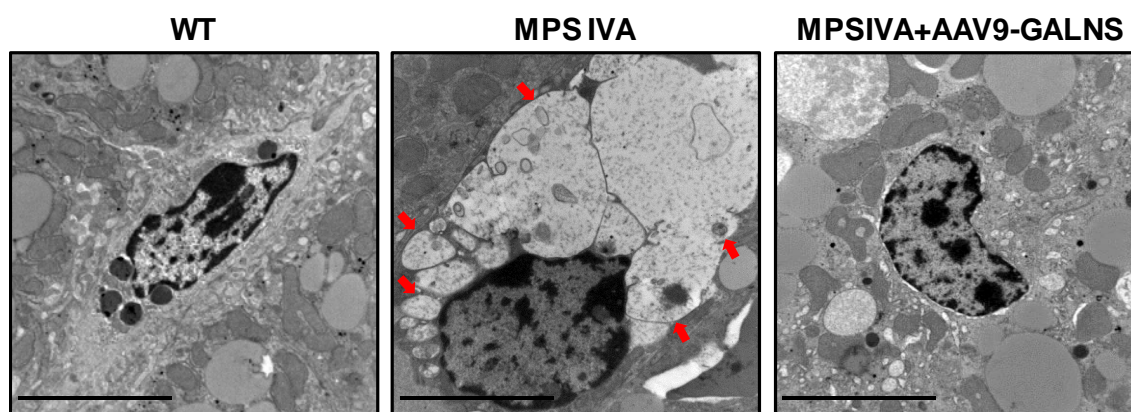


Figura 42. Análisis ultraestructural del hígado. Imágenes representativas de células de *Kupffer* de ratones machos WT, MPS IVA y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS de 4 meses de edad, en las que se observa una corrección del contenido en vesículas de acumulación de material poco electrodensito (flechas) 3 meses tras el tratamiento con el vector terapéutico. Imágenes representativas de 3 animales por grupo. La barra de escala indica 5 μ m.

En segundo lugar, se procedió a la evaluación del corazón, ya que las alteraciones en este órgano son una de las principales causas de muerte en los pacientes de Morquio A (Kampmann et al., 2016). Tal y como indica la bibliografía y como se ha observado en el análisis de expresión de GFP llevado a cabo en el estudio de biodistribución, el vector AAV9 es un buen vector para transducir el corazón. Al igual que en el hígado, se observó que la administración sistémica del vector AAV9-GALNS permitía un incremento de

actividad de 15 veces superior a los valores de actividad enzimática obtenidos en ratones WT (Figura 43A). Además, el estudio ultraestructural por MET reveló una completa normalización del contenido de vesículas de acumulación en las células de la capa subendocárdica de las válvulas del corazón de animales MPS IVA tratados con AAV9-GALNS, en comparación con animales MPS IVA no tratados (Figura 43B).

Estos resultados demuestran que la terapia génica era capaz de revertir la patología de las válvulas cardíacas del ratón MPS IVA.

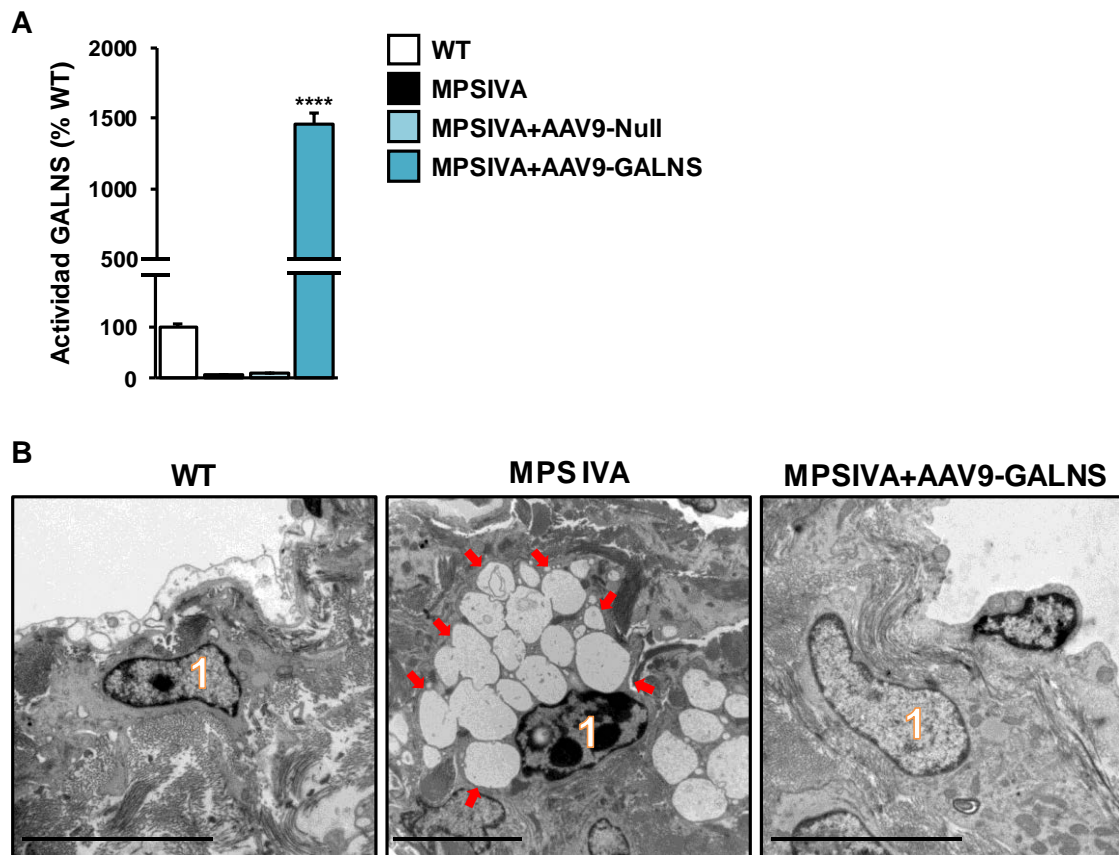


Figura 43. Actividad GALNS cardíaca y análisis ultraestructural del corazón. (A) Determinación de actividad GALNS en el corazón de ratones machos WT, MPS IVA, y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS de 7 meses de edad (después de 6 meses de tratamiento). Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. **** $p < 0,0001$ vs MPS IVA tratados con AAV9-Null. **(B)** Imágenes representativas del análisis ultraestructural de las válvulas cardíacas de ratones machos WT, MPS IVA y MPS IVA tratados de 4 meses de edad, donde se observa una completa corrección en el contenido de vesículas de acumulación de material poco electrodenso (flechas) en las células de la capa subendocárdica (1) de los animales MPS IVA tratados con AAV9-GALNS. Imágenes representativas de 3 animales por grupo.

Al igual que en las válvulas del corazón, se observó que el tratamiento de ratones MPS IVA con el vector AAV9-GALNS permitía una reducción de los niveles de QS

presentes en la tráquea de estos animales (Figura 44). La reducción en los niveles de QS en este órgano podría implicar una reducción de la mortalidad de estos pacientes, ya que las obstrucciones de la tráquea, provocadas por acúmulo de este GAG, son una de las principales complicaciones que generan riesgo de muerte en los pacientes de Morquio A, debido a las apneas y complicaciones derivadas (Doherty et al., 2018; Tomatsu et al., 2016).

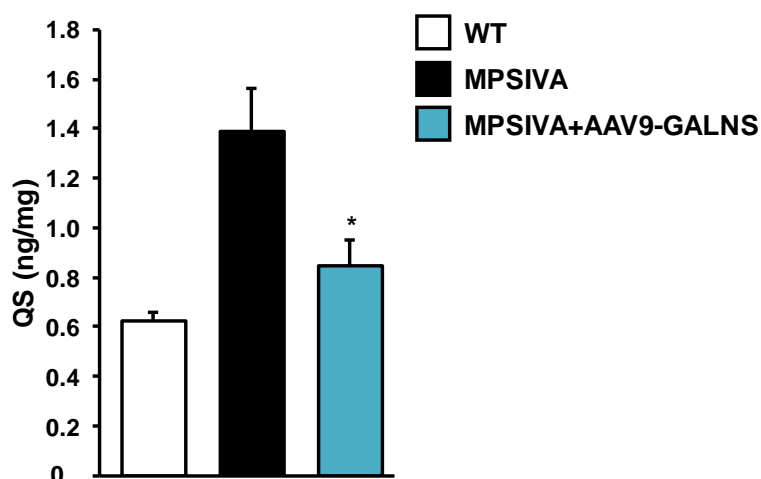


Figura 44. Reducción de los niveles de queratán sulfato en la tráquea. Cuantificación del contenido de QS en la tráquea de ratones machos WT, MPS IVA, y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS de 7 meses de edad (después de 6 meses de tratamiento). Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. * $p < 0.05$ vs MPS IVA.

El fémur y el tejido adiposo son otros de los tejidos en los que se observó una gran transducción viral en el estudio de biodistribución y que también presentaron niveles de actividad GALNS muy incrementados, en ratones MPS IVA tratados con AAV9-GALNS. El fémur de ratones MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS alcanzó niveles de actividad de 4 veces superior a los valores de actividad enzimática obtenidos en ratones WT (Figura 45A), mientras que el tejido adiposo de los mismos animales presentó un incremento de actividad de aproximadamente 44 veces superior a los valores obtenidos en ratones WT (Figura 45B). En ambos tejidos, se observaron valores de actividad prácticamente indetectables en los ratones MPS IVA no tratados o tratados con el vector AAV9-Null (Figura 45A, B).

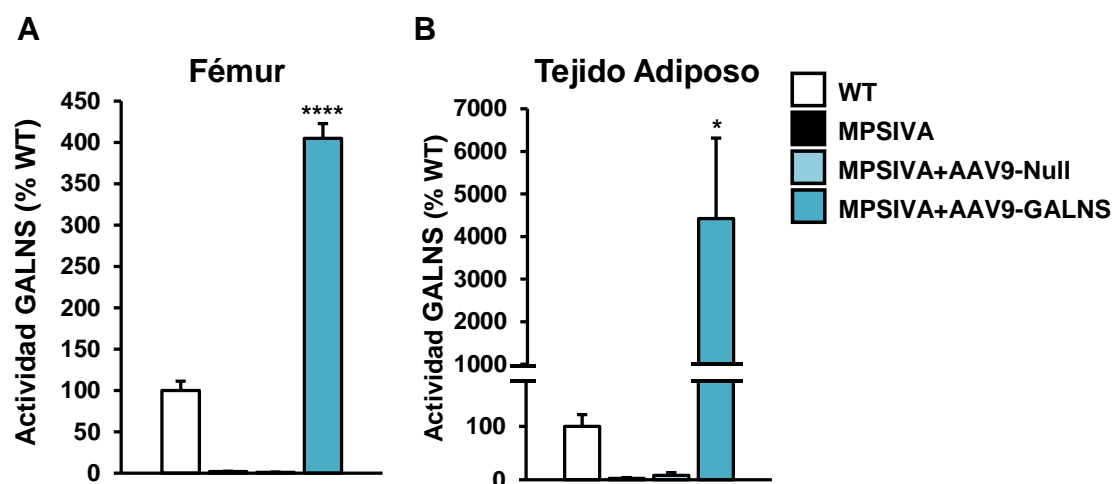


Figura 45. Incremento de actividad GALNS en el fémur y el tejido adiposo. Determinación de actividad GALNS en (A) fémur y (B) tejido adiposo de ratones machos WT, MPS IVA, MPS IVA tratados con el vector AAV9-Null y MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS de 7 meses de edad (después de 6 meses de tratamiento). Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ vs MPS IVA tratados con AAV9-Null.

El tejido adiposo no es uno de los principales tejidos afectados en la enfermedad de Morquio A, pero juntamente con el hígado son los órganos o tejidos periféricos con mayor potencial secretor. Con el fin de determinar si el incremento de actividad en estos tejidos se correlacionaba con un incremento de la actividad circulante, se procedió a la determinación de la actividad GALNS en suero de ratones MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS. El seguimiento de actividad GALNS circulante se realizó en muestras de suero obtenidas de forma periódica de ratones WT, MPS IVA, MPS IVA tratados con el vector AAV9-Null y MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS. Este seguimiento evidenció un incremento progresivo de actividad GALNS hasta los 2 meses post-tratamiento en los ratones MPS IVA tratados con el vector terapéutico. Pasados estos 2 meses, la actividad GALNS disminuyó ligeramente hasta alcanzar unos niveles estables aproximadamente 26 veces superior a los observados en ratones WT (Figura 46A).

En respuesta a este incremento de actividad GALNS circulante, se observó una completa normalización de los niveles patológicos de QS en el suero de ratones MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS, 6 meses después de su administración (Figura 46B).

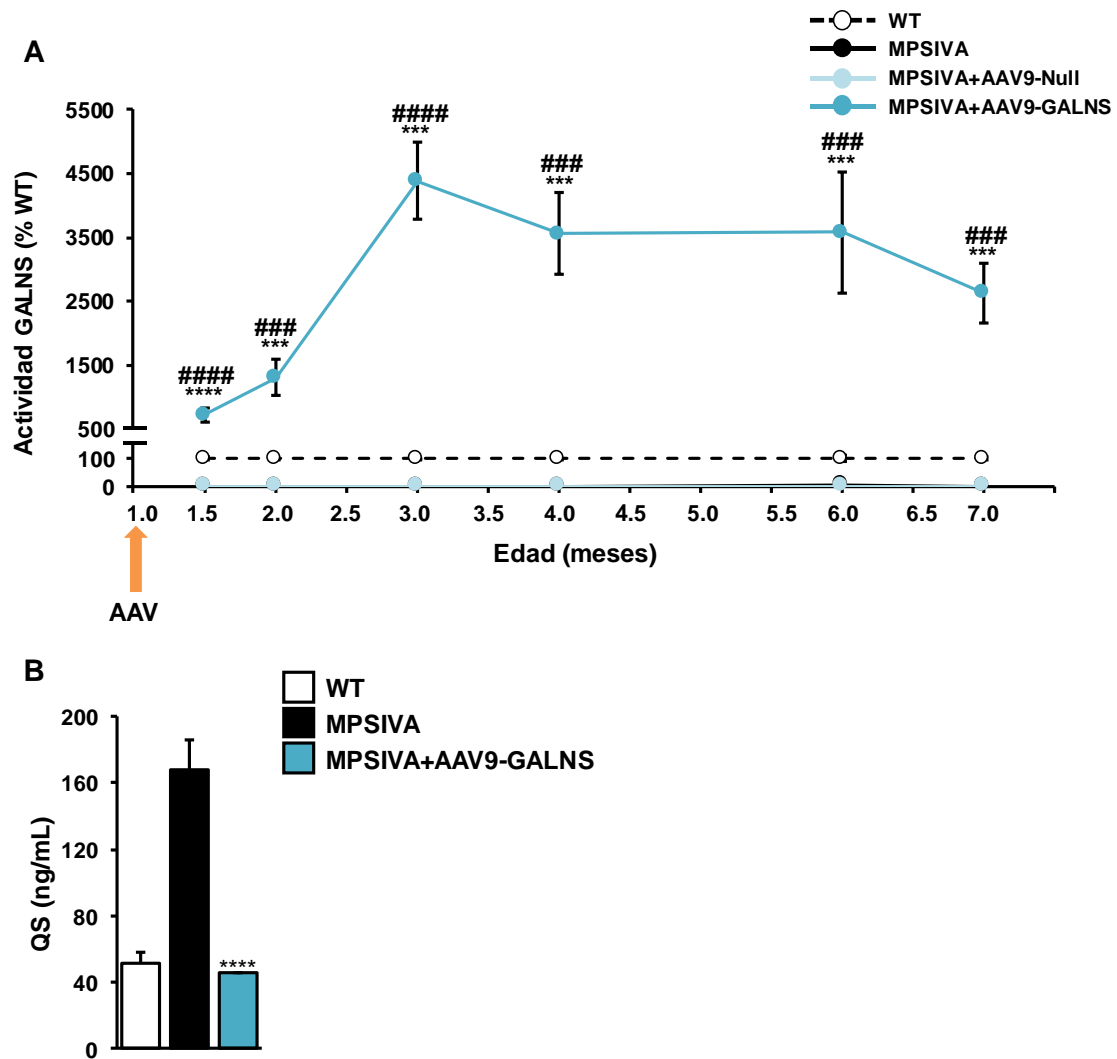


Figura 46. Seguimiento de actividad GALNS y normalización de los niveles de queratán sulfato en el suero. (A) Seguimiento de la actividad GALNS circulante de ratones machos WT, MPS IVA, MPS IVA tratados con el vector AAV9-Null y MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS durante 6 meses de tratamiento (hasta los 7 meses de edad) y (B) Cuantificación del contenido de QS en suero de ratones machos WT, MPS IVA y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS de 7 meses de edad (6 meses de tratamiento). Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs MPS IVA. ### $p < 0.001$, #### $p < 0.001$ vs MPS IVA tratados con AAV9-Null.

El incremento en los niveles circulantes de actividad GALNS permite que la enzima quede disponible para todos los tejidos periféricos, incluidos aquellos que no han sido transducidos por el vector AAV9-GALNS, permitiendo así la corrección de la patología lisosomal en estos tejidos por el mecanismo de corrección cruzada (Figura 2) (Ruzo et al., 2012b, 2012a; Tessitore et al., 2007).

3.2. Corrección de la patología ocular

La patología ocular observada en los pacientes de Morquio A se centra principalmente en la opacidad corneal. La cornea es un tejido avascular que se nutre en la parte anterior por la película lagrimal precorneal y en la parte posterior por el humor acuoso (Gipson et al., 2004). Esto convierte a la córnea en uno de los tejidos candidatos a recibir la enzima GALNS mediante el mecanismo de corrección cruzada.

El efecto del tratamiento sobre la patología ocular se evaluó en cortes histológicos de ojos mediante el método de Mowry (Figura 47A). Esta evaluación evidenció que después de 6 meses de tratamiento con el vector AAV9-GALNS, los animales MPS IVA presentaban una completa corrección del depósito de mucopolisacáridos en el epitelio de la córnea (Figura 47B).

Además, también se evaluó el efecto del tratamiento en la glándula lagrimal, ya que en el estudio fenotípico del ratón MPS IVA se observó que la deficiencia de la enzima GALNS en estas glándulas provocaba elevados acúmulos de QS (Figura 22A). El análisis de LC-MS/MS en estas glándulas evidenció una completa normalización de los niveles de QS en los animales MPS IVA tratados con AAV9-GALNS (Figura 48A). El contenido de GAGs en este tejido también se pudo valorar mediante la tinción con *toluidine blue* que permitió observar una completa corrección del acúmulo de GAGs en los animales tratados con el vector terapéutico en comparación con los animales MPS IVA no tratados, alcanzando un aspecto indistinguible a las glándulas de un ratón WT (Figura 48B).

También se llevó a cabo un estudio de ultraestructura por MET de los alveolos lagrimales, que reveló una completa normalización en la presencia de vacuolas de acúmulo de material poco electrodensito en estos tipos celulares en ratones MPS IVA tratados con AAV9-GALNS (Figura 48C).

Este estudio demostró la capacidad de la terapia génica con AAV9-GALNS para revertir las alteraciones observadas en la córnea y glándula lagrimal del ratón MPS IVA.

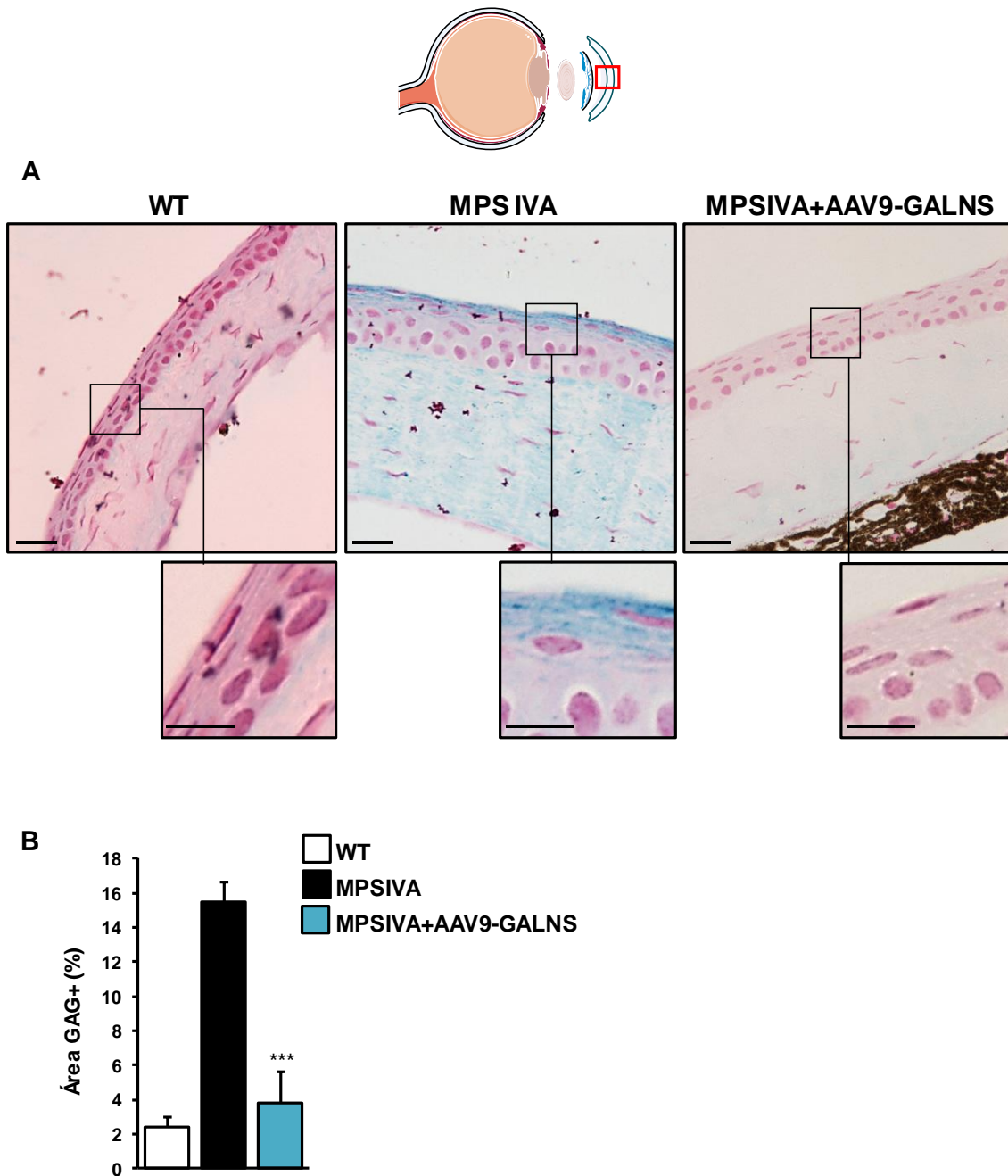


Figura 47. Corrección de la patología ocular. (A) Imágenes representativas del epitelio de la córnea y (B) cuantificación del área azul (contenido en GAGs) sobre el epitelio corneal de ratones WT, MPS IVA y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS machos de 7 meses de edad. Se observó una completa restauración del depósito de mucopolisacáridos en los animales tratados con el vector terapéutico. Imágenes representativas de 5-8 animales por grupo. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5-8 animales por grupo. *** $p < 0.001$ vs MPS IVA. La barra de escala indica 20 μm (10 μm *inset*).

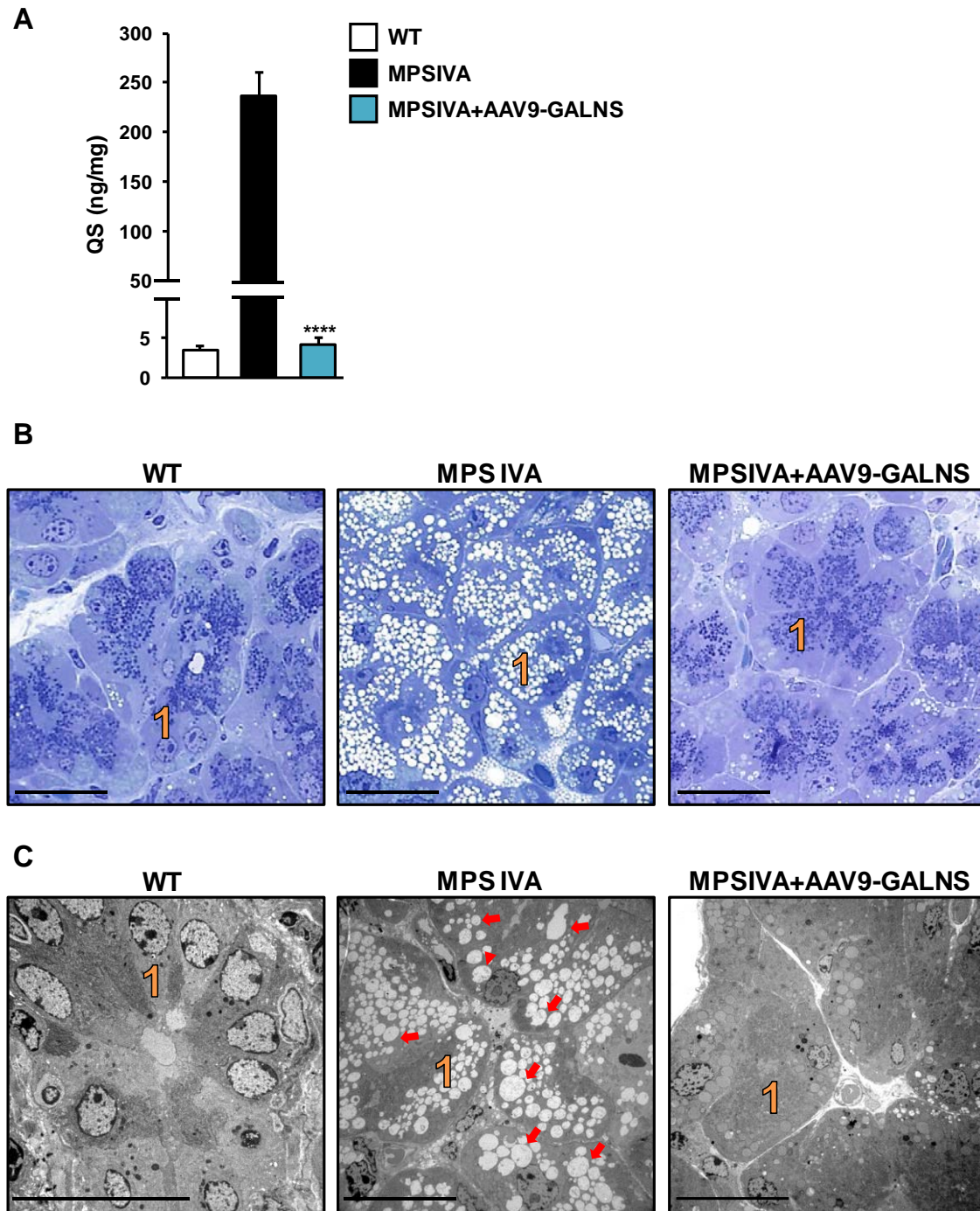


Figura 48. Corrección del contenido de queratán sulfato y de las alteraciones morfológicas de la glándula lagrimal. (A) Cuantificación del contenido de QS mediante LC-MS/MS, **(B)** tinción con *toluidine blue* en glándula lagrimal, **(C)** análisis ultraestructural de los alveolos lagrimales de ratones machos WT, MPS IVA y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS de 4 meses de edad. Imágenes representativas de 3 animales por grupo. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 4 animales por grupo. **** $p < 0.0001$ vs MPS IVA. La barra de escala indica 20 μ m.

3.3. Efecto del tratamiento sobre la patología del sistema nervioso central

En primer lugar, se valoró si el tratamiento con el vector AAV9-GALNS era capaz de revertir el acúmulo de QS y la neuroinflamación observada en el cerebro de los ratones MPS IVA. Para ello, se evaluó si el vector AAV9-GALNS era capaz de cruzar la BHE y dar lugar a actividad GALNS en el SNC. Este estudio evidenció un gran incremento de la actividad GALNS en las regiones de cerebro analizadas de ratones MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS. En estos ratones, la actividad GALNS alcanzó niveles de entre 1.5 y 2 veces superior respecto a los valores obtenidos en ratones WT (Figura 49A). En respuesta a este incremento de actividad en las regiones II y III del cerebro, se observó una completa normalización de los niveles patológicos de QS en dichas regiones (Figura 49B).

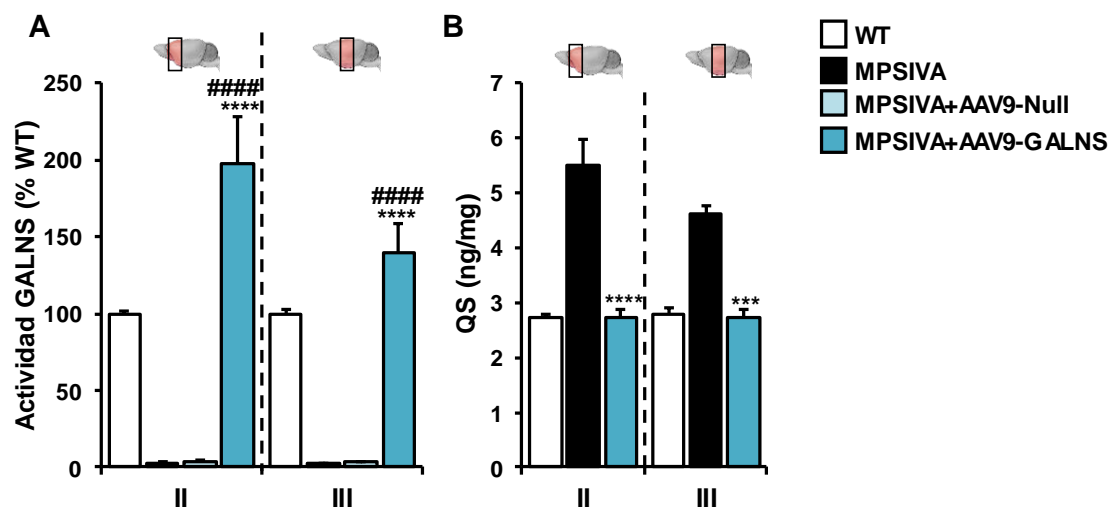


Figura 49. Determinación de actividad GALNS en cerebro y corrección del contenido de queratán sulfato. (A) Determinación de actividad GALNS y (B) cuantificación del contenido de QS mediante LC-MS/MS en las regiones II y III del cerebro de ratones machos WT, MPS IVA y MPS IVA tratados de 7 meses de edad (después de 6 meses de tratamiento). Un esquema de las secciones coronales de cerebro (II-III) usadas para el análisis se muestra en la parte superior de la gráfica. Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 5 animales por grupo. **** $p < 0.0001$ vs MPS IVA. ##### $p < 0.001$ vs MPS IVA tratados con AAV9-Null.

Este aumento de actividad también se correlacionó con una corrección del contenido de vesículas de acumulación, tanto en las células gliales perineuronales y en las células endoteliales de la amígdala como en los macrófagos perineuronales y las células endoteliales del giro dentado de ratones MPS IVA (Figura 50A y B)).

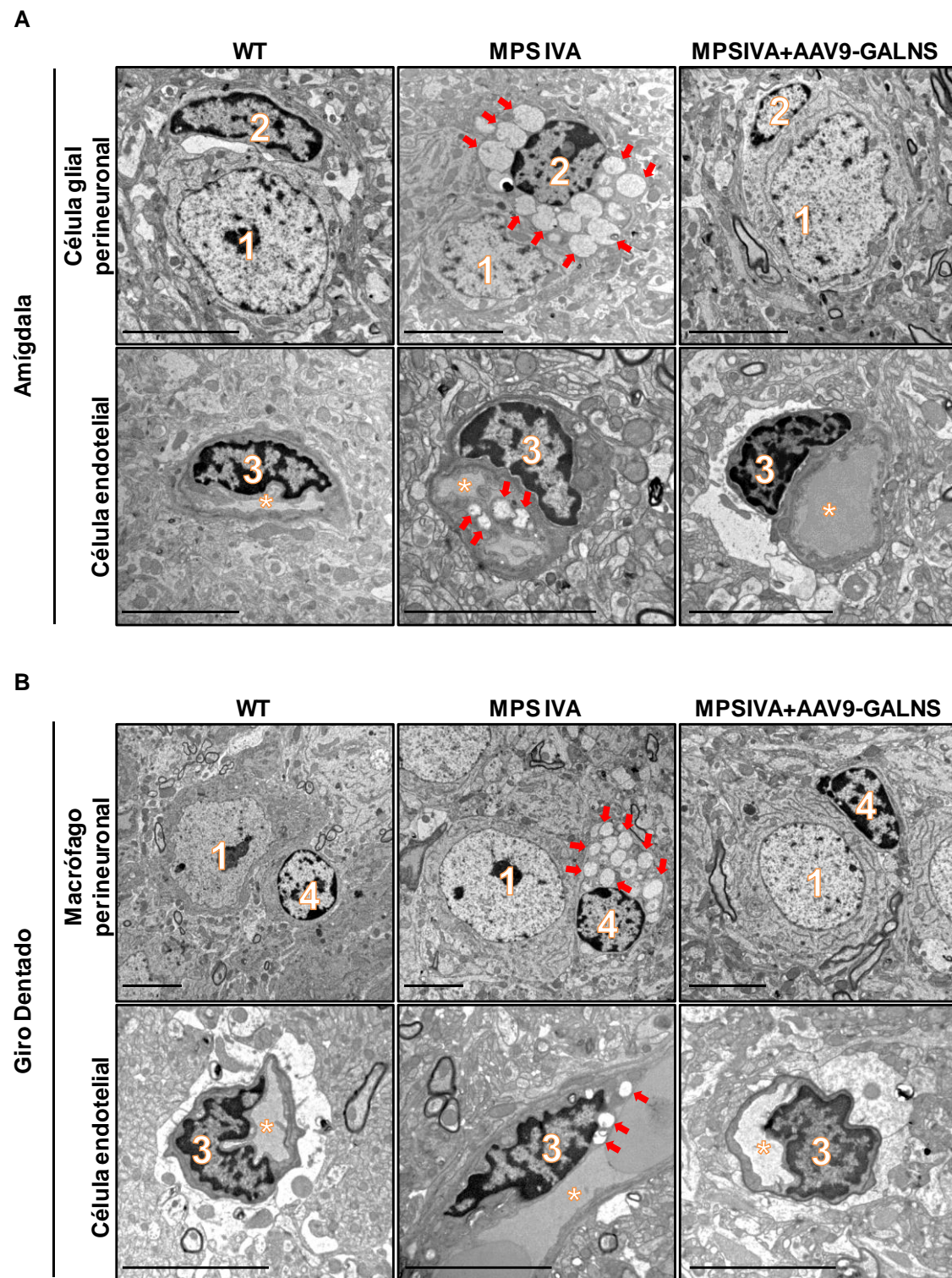


Figura 50. Análisis del cerebro por Microscopía Electrónica de Transmisión. Imágenes representativas de la (A) amígdala y del (B) giro dentado de ratones machos WT, MPS IVA y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS de 4 meses de edad. Los animales MPS IVA tratados con AAV9-GALNS se observó una normalización del contenido de acumulación de material poco electrodensó (flechas) en las células gliales perineuronales y células endoteliales de la amígdala y en los macrófagos perineuronales y células endoteliales del giro dentado después de 3 meses de tratamiento con el vector viral AAV9-GALNS. Imágenes representativas de 2-3 animales por grupo. (1: Neurona, 2: Célula glial perineuronal, 3: Célula endotelial, 4: Macrófago perineuronal, *: Luz del vaso sanguíneo). La barra de escala indica 5 μ m.

El estudio fenotípico del ratón MPS IVA evidenció que el acúmulo patológico de QS en el cerebro provocaba un incremento en el número de astrocitos activados (GFAP+) en las diferentes regiones del córtex cerebral, dando lugar a una marcada neuroinflamación. No obstante, una única administración intravenosa del vector AAV9-GALNS en ratones MPS IVA permitió una completa corrección de la neuroinflamación en todas las regiones analizadas del córtex cerebral de los ratones MPS IVA tratados (Figura 51).

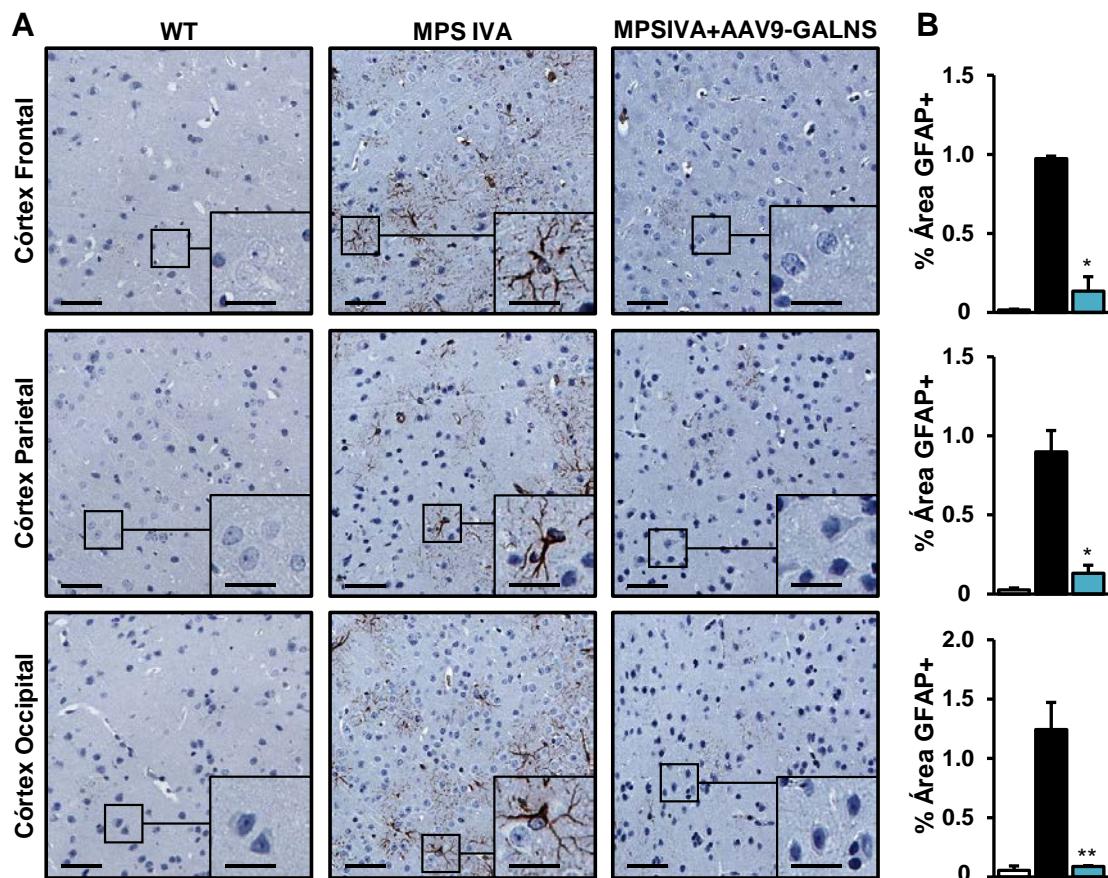


Figura 51. Corrección de la astrocitosis en el cerebro de ratones MPS IVA. (A) Imágenes representativas de cortes histológicos de córtex tras el análisis inmunohistoquímico con un anticuerpo específico para GFAP y (B) cuantificación del marcaje contra GFAP en diferentes zonas del córtex cerebral de ratones machos WT, MPS IVA y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS de 7 meses de edad. Imágenes representativas de 4 animales por grupo. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 4 animales por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs MPS IVA. La barra de escala indica 50 μm (25 μm *inset*).

4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS DE MANTENER LOS NIVELES SÉRICOS DE GALNS ELEVADOS EN AUSENCIA DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA POR PARTE DEL HÍGADO

Debido a la pronta aparición de la sintomatología en la mayoría de pacientes de MPS IVA, es necesario el tratamiento de éstos cuando son muy jóvenes. El principal problema que alberga el tratamiento por vía intravenosa de pacientes tan jóvenes radica en el hecho de que los vectores AAV son vectores virales no integrativos, con lo que en cuanto la célula transducida se divide, se diluirá la expresión del transgén. Esto es especialmente evidente cuando se transduce el hígado en animales muy jóvenes.

El estudio de biodistribución evidenció que, tanto con el vector AAV8 como con el vector AAV9, el principal órgano transducido era el hígado (Figura 37), órgano que se encuentra en un momento de alta tasa de división celular a la edad media de diagnóstico de las formas más severas de Morquio A (3-5 años). Por lo tanto, la administración del vector AAV8 o AAV9 a esta edad podría llevar a una disminución progresiva de la expresión del transgén por parte del hígado a medida que este órgano va creciendo.

Por este motivo, se realizó un estudio con el fin de comprobar el papel de otros tejidos, aparte del hígado, en la contribución a los niveles circulantes de GALNS. Para este estudio se diseñó una estrategia centrada en la administración de vectores AAV9-GALNS en los que se añadió una secuencia reconocida por un microRNA (miRNA) únicamente presente en el hígado. Estudios sobre el perfil de expresión de los miRNAs han mostrado la existencia de miRNA que están altamente expresados de manera selectiva en tejidos determinados. Así se ha demostrado que el miRNA122a, es un miRNA específico de hígado (Chang et al., 2004; Lagos-Quintana et al., 2002).

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes que tienen un papel regulador en el silenciamiento de genes a nivel post-transcripcional. En su forma madura se unen específicamente a determinados mRNAs mediante el reconocimiento de secuencias diana ubicadas en las regiones 3' no traducidas (3'-UTRs) que son total o parcialmente complementarias al miRNA. Esta asociación lleva a la destrucción de los mRNA, evitando así su posterior traducción (Kelly and Russell, 2009). De esta manera, se incorporó al vector AAV9-GALNS la secuencia diana del miRNA122a (MiRT122a). Así, al administrar el vector terapéutico, si el vector transduce el hígado, el transcrito producido en el núcleo de la célula hepática sería transportado al citoplasma, donde la secuencia MiRT122a presente al final del mRNA de GALNS sería reconocida por el miRNA122a (Figura 52A). A continuación, la proteína Argonata2 (AGO2) se uniría a este dúplex y ayudaría a la formación del *MicroRNA-induced silencing complex*

(miRISC) induciendo así el corte y posterior degradación del RNA de doble cadena y, consecuentemente, del transgén. Si por el contrario la transducción del vector terapéutico tiene lugar en otro órgano o tejido diferente al hígado, el mRNA no será procesado por miRISC y podrá ser traducido a proteína (Figura 52B).

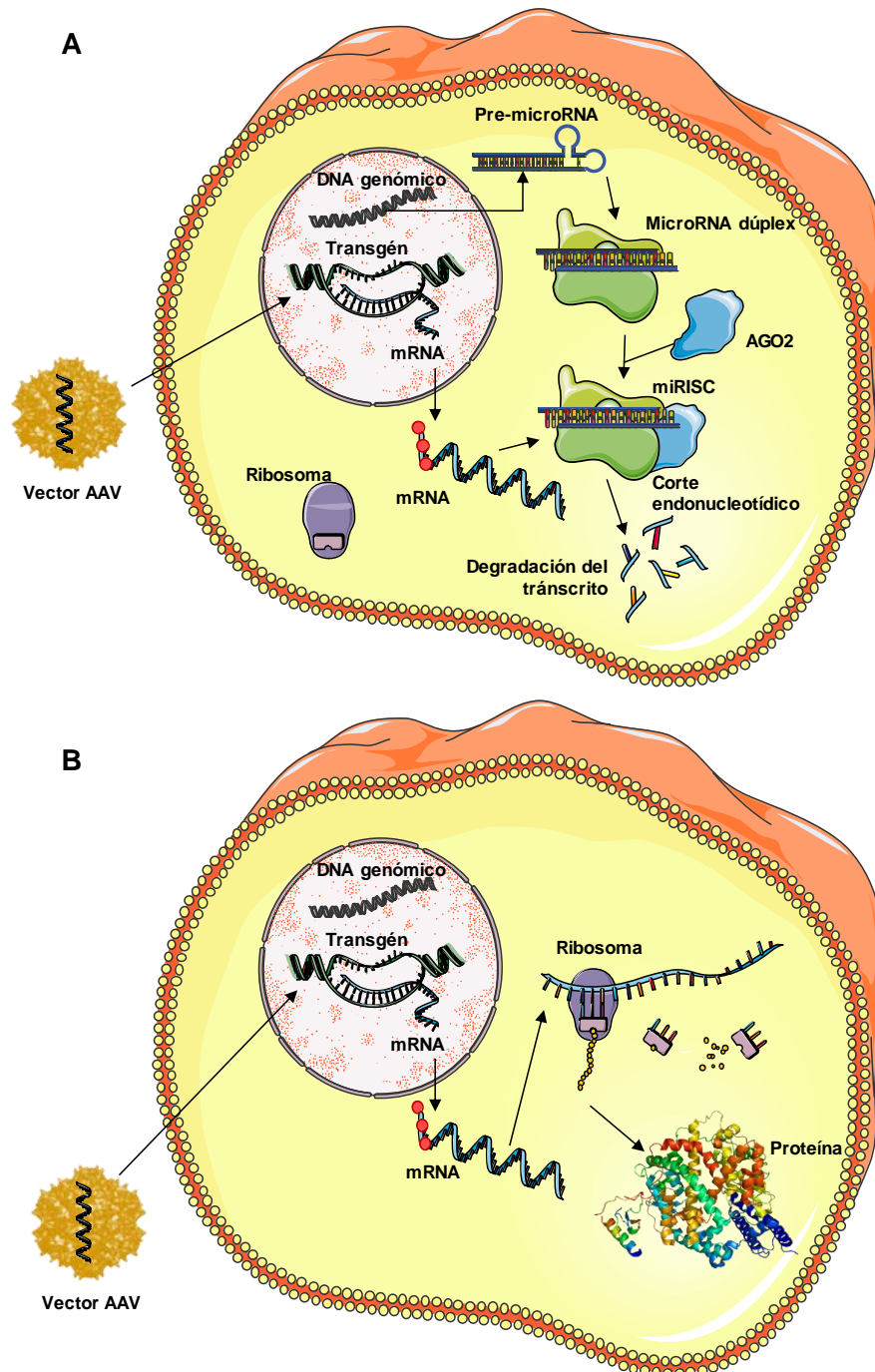


Figura 52. Principio de la supresión de expresión del transgén mediante microRNAs. Después de la transducción de la célula por parte de los vectores AAV, el transgén de interés se transcribe en el núcleo. Posteriormente, el transcrito que contiene la secuencia MiRT122a (círculos rojos) es transportado al citoplasma. **(A)** Si la transducción ha tenido lugar en el hígado, el miRNA122a se unirá al MiRT122a y este RNA de doble cadena se cortará y se degradará. **(B)** Si por el contrario la transducción ha tenido lugar en otro tejido u órgano diferente al hígado, el transcrito será traducido a proteína. AGO2: Argonauta 2; miRISC: *MicroRNA-induced silencing complex* (Adaptado de (Geisler and Fechner, 2016)).

4.1. Construcción y administración del vector viral AAV9-GALNS-MiRT

Con el objetivo de determinar la producción sistémica de la enzima GALNS por parte de otros tejidos diferentes al hígado, se diseñó un vector que permite expresar el gen *Galns* en todos los tejidos excepto en el hígado. De esta manera se simularía la situación en la que se encontraría un paciente adulto que ha perdido con el tiempo parte de la expresión del gen *Galns* en el hígado. Para ello, se utilizó el vector viral AAV9 que transportaba una copia corregida del gen *Galns* junto a 4 copias de la secuencia MiRT122a, bajo el control del promotor ubicuo CAG. El vector AAV9-GALNS-MiRT fue administrado a una dosis de 1×10^{12} vg/ratón por vía intravenosa en ratones MPS IVA machos de 2 meses de edad (Figura 53). Así mismo, el efecto del vector AAV9-GALNS-MiRT fue comparado con el efecto del vector AAV9-GALNS, administrado también por vía intravenosa y a la misma dosis en ratones MPS IVA. El grupo experimental también lo formaron ratones sanos WT y MPS IVA no tratados, hermanos de camada.

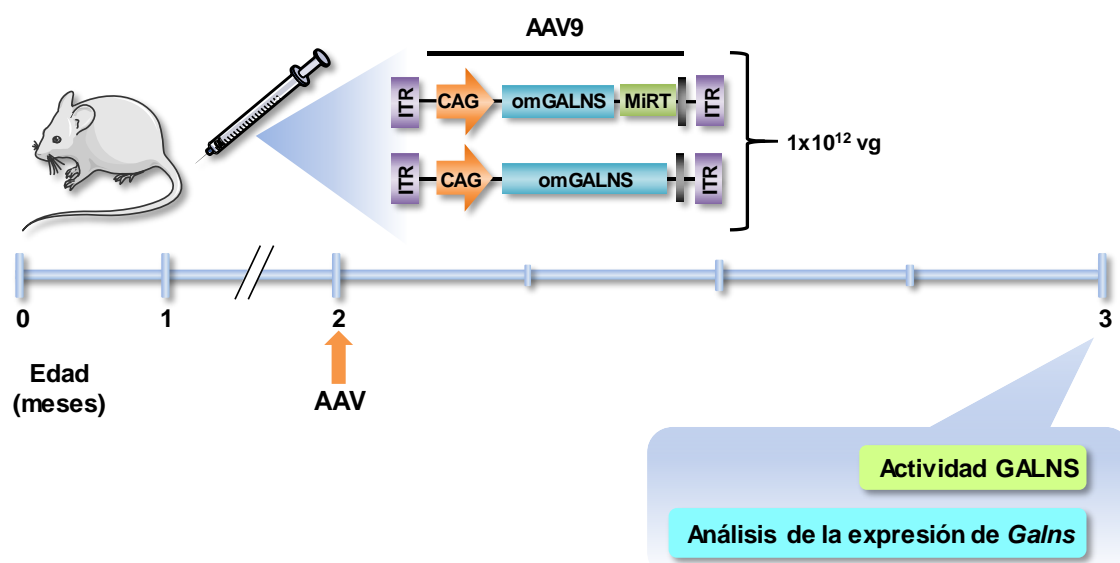


Figura 53. Diseño experimental. Los vectores virales AAV9-GALNS-MiRT y AAV9-GALNS fueron administrados vía intravenosa en ratones MPS IVA machos de 2 meses de edad. El sacrificio se realizó pasado 1 mes después de la administración viral, momento en el que se analizaron todos los parámetros que se indican en la figura.

Para evaluar el efecto del tratamiento intravenoso con el vector viral AAV9-GALNS-MiRT en ratones MPS IVA a nivel somático, en primer lugar, se analizó la expresión de *Galns* en hígado, tejido adiposo y corazón. A continuación, se determinó la actividad GALNS en hígado, fémur, corazón, tejido adiposo y suero. Por último, se cuantificó el

contenido de QS en suero de ratones WT, MPS IVA, MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS y MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS-MiRT (MPSIVA+AAV9-GALNS-MiRT).

El análisis de expresión de la versión optimizada del gen *Galns* en el hígado mostró una expresión prácticamente indetectable de este gen en los ratones MPS IVA tratados con AAV9-GALNS-MiRT en comparación con la expresión de *Galns* observada en los animales MPS IVA tratados con AAV9-GALNS (Figura 54A). En cambio, se observó que la secuencia diana para el miRNA 122a, no provocaba ninguna alteración en el nivel de expresión del gen *Galns* en otros tejidos analizados, como en el tejido adiposo (Figura 54B) o en el corazón (Figura 54C).

Esta reducción en la expresión de *Galns* en el hígado de los animales tratados con AAV9-GALNS-MiRT se tradujo en una reducción estadísticamente significativa de la actividad GALNS detectada en extractos de este tejido (Figura 54D). La actividad que se observó en el hígado de los animales MPS IVA tratados con AAV9-GALNS-MiRT procede, muy probablemente, de la enzima circulante que los hepatocitos son capaces de captar. Se observó que en el resto de los tejidos analizados (tejido adiposo, corazón y fémur) la actividad GALNS de los animales MPS IVA tratados con AAV9-GALNS-MiRT no difería de una forma estadísticamente significativa de la actividad GALNS observada en los animales MPS IVA tratados con AAV9-GALNS (Figura 54E-G). Además, en el grupo de animales MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS-MiRT se obtuvieron valores circulantes de actividad GALNS que, al igual que en el fémur, corazón y tejido adiposo, no eran estadísticamente significativos de los obtenidos en los animales MPS IVA tratados con AAV9-GALNS (Figura 54H). Estos resultados indicaron que el hígado no era el único tejido responsable de la secreción de la enzima al riego sanguíneo.

Finalmente, se evaluó si el tratamiento con el vector AAV9-GALNS-MiRT, al igual que con el vector AAV9-GALNS, era capaz de revertir el acúmulo de QS circulante. Este análisis evidenció que los animales MPS IVA tratados con AAV9-GALNS-MiRT presentaban una completa corrección de los niveles de QS en suero, los cuales eran indistinguibles de los niveles obtenidos tanto en el grupo WT como en los ratones MPS IVA tratados con AAV9-GALNS (Figura 54I).

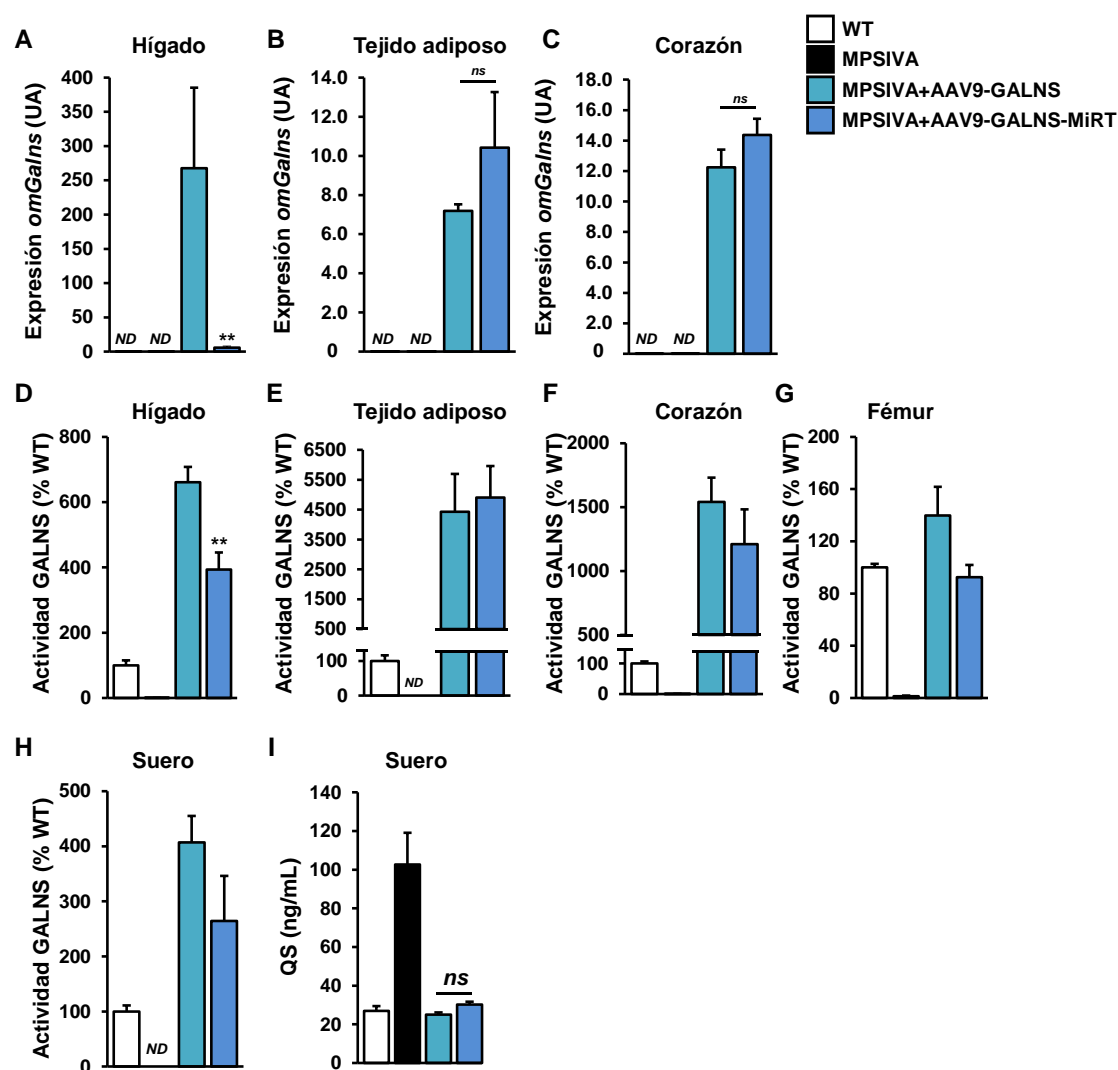


Figura 54. Análisis de expresión y actividad GALNS en diferentes tejidos y cuantificación del contenido de QS en suero. Determinación de la expresión de la versión optimizada de *Galns* en (A) hígado, (B) tejido adiposo y (C) corazón de ratones machos WT, MPS IVA, MPS IVA tratados con AAV9-GALNS y MPS IVA tratados con AAV9-GALNS-MiRT un mes tras la administración de los vectores. (D) Determinación de la actividad GALNS en hígado, (E) tejido adiposo, (F) corazón, (G) fémur y (H) suero en los mismos grupos de animales. (I) Cuantificación de los niveles de QS en suero analizados en los mismos grupos de animales. El tratamiento con el vector AAV9GALNS-MiRT únicamente disminuyó de forma estadísticamente significativa la actividad GALNS en el hígado, evento que no impidió, en los mismos animales, normalizar su contenido en QS circulante. Los resultados que se muestran corresponden a la media \pm SEM de 3-5 animales por grupo. ** $p < 0.01$, vs MPS IVA tratados con AAV9-GALNS. UA: Unidades Arbitrarais, ND: No detectable, ns: estadísticamente no significativo.

Por lo tanto, este estudio demuestra la capacidad del vector AAV9-GALNS para ofrecer un tratamiento de la enfermedad de Morquio A a largo plazo. Los resultados obtenidos sugieren que a pesar de la disminución progresiva de la expresión de *Galns* en el hígado, el resto de tejidos transducidos serán capaces de producir la enzima GALNS y secretarla al riego sanguíneo, compensando así la pérdida de aporte enzimático por parte del hígado.

V. Discusión

La MPS IVA es una de las 7.000 enfermedades minoritarias que existen y una de entre las 50 LSDs descritas. Actualmente, existe una terapia para Morquio A basada en la administración intravenosa de la enzima GALNS recombinante (*VimizimTM*). Dicho tratamiento es capaz de revertir los niveles de QS circulante y mejorar la capacidad locomotora de los pacientes, aunque no ha sido capaz de revertir los problemas auditivos, cardíacos, la opacidad corneal ni las alteraciones esqueléticas de los pacientes (Hendriksz et al., 2014, 2015). La ausencia de una completa eficacia terapéutica, junto con la necesidad de realizar administraciones periódicas de la enzima y el elevado coste económico que supone esta terapia, hace necesario el desarrollo de otras aproximaciones terapéuticas para Morquio A. Dada esta necesidad, la terapia génica viral, concretamente la terapia génica *in vivo* basada en vectores AAV, se postula como una de las alternativas más atractivas, ya que ha demostrado su eficacia en el tratamiento a largo plazo de diversas enfermedades (Bainbridge et al., 2015; Buchlis et al., 2012; Nathwani et al., 2011; Testa et al., 2013). Por este motivo, el principal objetivo de la presente tesis doctoral se centró en el desarrollo de una aproximación de terapia génica basada en la administración de un vector AAV codificante para la enzima GALNS (AAV-GALNS) de forma intravenosa para el tratamiento de las alteraciones fenotípicas de un ratón modelo de la MPS IVA.

En primer lugar, se generó un modelo de ratón *knock out* de MPS IVA a partir de mESC, obtenidas del *International Mouse Phenotyping Consortium*, con el gen *Galns* disrumpido. Para la generación de este modelo se utilizó un fondo genético puro C57BL/6. La elección de este fondo genético fue debida a que en anteriores trabajos con otros modelos de ratón MPS IVA de fondo genético mixto C57BL/6 x 129Sv, se había observado que la purificación del fondo genético hacia C57BL/6 permitía a los animales desarrollar leves alteraciones a nivel del sistema esquelético (Rowan et al., 2013). Por el contrario, los ratones MPS IVA con fondo genético mixto C57BL/6 x 129Sv no eran capaces de desarrollar estas alteraciones (Tomatsu et al., 2003, 2005, 2007).

Una vez se obtuvieron los ratones homocigotos para la disrupción de *Galns*, se realizó un estudio fenotípico a diferentes edades de los diferentes órganos y tejidos que suelen estar afectados en pacientes de Morquio A.

En el síndrome de Morquio A el principal sistema afectado es el esquelético. Estas alteraciones a nivel esquelético son debidas principalmente a alteraciones en la condrogénesis de las placas de crecimiento de los huesos largos, provocadas por la acumulación patológica de los GAGs Queratán Sulfato (QS) y Condroitín 6-Sulfato (C6S) en la matriz extracelular y en el interior de los condrocitos (Byers et al., 2018;

Tomatsu et al., 2014). Por este motivo, en primer lugar, se cuantificó la presencia de estos GAGs en la placa de crecimiento de la tibia y del fémur de ratones MPS IVA y ratones WT. Este análisis evidenció que tanto ratones WT como MPS IVA, no presentaban niveles detectables de QS en la placa de crecimiento de la tibia ni del fémur. Este resultado estaba de acuerdo con estudios anteriores, en los que se habían descrito la ausencia de este GAG en el tejido esquelético del ratón (Venn and Mason, 1985). También, se observó que los ratones MPS IVA no presentaban una concentración de C6S superior a la observada en animales WT. En humanos se ha observado que a nivel de la placa de crecimiento, tanto de la tibia como del fémur, se obtienen valores de Condroitín 4-Sulfato (C4S) y C6S muy similares (se encuentran en una relación aproximadamente de 1:1) (Mourão, 1988). Por el contrario, la cuantificación de GAGs en la placa de crecimiento de tibia y fémur de ratones WT evidenció que en el ratón la relación C4S:C6S era de 20:1 en la tibia y de 28:1 en el fémur. Por lo tanto, se observó que en la placa de crecimiento del ratón el C6S representa una proporción de los glucosaminoglicanos totales muy inferior a la observada en humanos.

Mediante análisis de micro-CT, se observó que la ausencia de acumulación patológica de GAGs en la placa de crecimiento de los huesos largos se traducía en una falta de diferencias en el crecimiento longitudinal de la tibia de ratones WT y MPS IVA de 7 meses de edad. Además, el análisis morfológico del sistema esquelético de ratones WT y MPS IVA de 12 meses de edad reveló una completa ausencia de diferencias en el peso, la morfología y el tamaño de los diferentes huesos. Esta falta de diferencias a nivel óseo se tradujo en una ausencia de diferencias en el peso corporal y en la longitud entre animales MPS IVA y WT.

La falta de QS en la placa de crecimiento y el hecho de que el ratón MPS IVA no sea capaz de acumular C6S de forma patológica en comparación con un ratón WT, podría ser una posible explicación al hecho de que el ratón MPS IVA no sea capaz de reproducir la patología esquelética observada en pacientes de Morquio A.

A pesar de la ausencia de la patología esquelética observada en pacientes humanos, el ratón MPS IVA generado en la presente tesis doctoral desarrollaba otras alteraciones características de la enfermedad de Morquio A. Entre estas alteraciones se encuentra la acumulación de QS en diferentes órganos y tejidos somáticos tales como el hígado, el corazón, la tráquea y el suero (Doherty et al., 2018; Kampmann et al., 2016; Montaña et al., 2007a). Dicha acumulación también se evidenció en los otros ratones de MPS IVA ya descritos (Tomatsu et al., 2003, 2005, 2007). Además, el ratón MPS IVA generado en la presente tesis doctoral presentaba acumulación de GAGs en el epitelio

de la córnea, causante de la opacidad corneal descrita en pacientes de Morquio A (Hendriksz et al., 2013), y de QS en las glándulas lagrimales, alteración nunca antes descrita en pacientes humanos ni en ninguno de los otros modelos de ratón de Morquio A. Finalmente, también se observó una mayor acumulación de QS a nivel del SNC de ratones MPS IVA en comparación con animales WT, la cual se tradujo en una marcada neuroinflamación en diferentes regiones del córtex de estos animales.

Al igual que se observó en la placa de crecimiento del fémur y la tibia, la cuantificación de los niveles de condroitín sulfato en los diferentes órganos de ratones MPS IVA evidenció que el C6S, a pesar de ser uno de los glucosaminoglicanos degradados por la enzima GALNS, no se encuentra incrementado en comparación con los niveles de C6S observado en los tejidos de ratones WT. Además, se observó que en todos los órganos analizados tanto de ratones WT como MPS IVA, el C6S presentaba una proporción muy inferior en comparación a los niveles de C4S observados en cada tejido.

A pesar de que la pérdida de actividad GALNS en el sistema esquelético del ratón MPS IVA no provocaba ninguna alteración patológica del hueso, éste es el principal órgano afectado en los pacientes de Morquio A. Por este motivo, una vez fenotipado el ratón MPS IVA, se llevó a cabo un estudio con el fin de determinar el serotipo de AAV que era capaz de proporcionar una mayor transducción del hueso y otros órganos y tejidos afectados en estos pacientes. Para este estudio, dada la amplia biodistribución descrita tras la administración intravenosa de los vectores AAV8 y AAV9 (Zincarelli et al., 2008), se utilizaron los vectores virales AAV8-GFP y AAV9-GFP administrados por vía intravenosa a las dosis de 1×10^{11} vg/ratón y 1×10^{12} vg/ratón. Este estudio de biodistribución se llevó a cabo tanto en ratones WT como en ratones MPS IVA, con el fin de comprobar si la transducción de dichos vectores se veía modificada por las posibles alteraciones a nivel celular asociadas a la MPS IVA.

Mediante inmunohistoquímica contra la proteína GFP se observó que tanto en ratones WT como en ratones MPS IVA los vectores AAV8 y AAV9 mostraban una gran transducción del hueso dependiente de dosis. Además, se evidenció que ambos vectores presentaban una eficiencia de transducción muy similar y que dicha eficiencia no se veía afectada por el genotipo del animal. Se observó expresión de GFP en la región de la diáfisis más próxima a la metáfisis y en el endostio tanto del fémur como de la tibia. Ambas regiones del hueso constituyen regiones muy ricas en osteoblastos. En la zona próxima a la metáfisis, los condrocitos hipertróficos atraen a los osteoblastos, los cuales se encargan de la secreción de matriz ósea dando lugar al crecimiento

longitudinal de los huesos largos (Shapiro and Forriol, 2005), y en el endostio los osteoblastos permiten el crecimiento radial del hueso (Morrison and Scadden, 2014). Mediante inmunohistoquímica doble contra GFP y Osteocalcina, proteína marcadora de osteoblastos, se evidenció que parte de las células transducidas en el hueso, tanto con AAV8 como con AAV9, eran osteoblastos. Dichas células, principalmente las presentes en el endostio, a medida que van secretando los materiales de la matriz ósea van quedando envueltas por estos materiales. Finalmente, se diferencian a osteocitos, que son células maduras que constituyen la mayor parte del tejido óseo y que han perdido la capacidad de división (Roca and Castañeda, 2005). Esta última característica sugiere que los osteoblastos, una vez diferenciados a osteocitos, serían capaces de producir el transgén y secretarlo durante toda la vida del hueso, dando lugar así a una producción del transgén a largo plazo en este tejido.

Paralelamente, se analizó la biodistribución de los vectores AAV8 y AAV9 mediante el análisis de expresión de GFP por fluorimetría en diferentes huesos, tejidos somáticos y sistema nervioso central. Nuevamente, se evidenció que la expresión de GFP era más elevada en los animales inyectados con la dosis más alta y que no había diferencias en la biodistribución entre animales WT y MPS IVA. En cuanto a las diferencias entre vectores se evidenció que, tal y como ya estaba descrito en la bibliografía, tanto el vector AAV8 como el vector AAV9 presentan un elevado tropismo por el hígado (Gao et al., 2002; Ruzo et al., 2012; Wang et al., 2015) y que el vector AAV9, a diferencia del AAV8, era capaz de transducir el SNC debido a su capacidad para cruzar la BHE (Ruzo et al., 2012; Saraiva et al., 2016; Zincarelli et al., 2008). A pesar de estas diferencias, ambos vectores mostraron una transducción eficaz de los diferentes órganos y tejidos afectados en la enfermedad de Morquio, como el hueso, el corazón y la tráquea.

Para el desarrollo de una aproximación de terapia génica para el tratamiento de la enfermedad de Morquio A, finalmente se utilizó el vector AAV9. En primer lugar, este vector junto con el vector AAV8 presentó una transducción eficaz de los principales tejidos y órganos afectados en pacientes de Morquio A. Además, el vector AAV9 es capaz de cruzar la BHE, hecho que permitiría contrarrestar la posible alteración del SNC en pacientes de Morquio A.

Dado que el principal órgano afectado en los pacientes de Morquio A es el hueso, uno de los objetivos de la terapia génica desarrollada en la presente tesis doctoral fue el restablecimiento de la expresión de *Galns* y el incremento de la actividad GALNS en este órgano. Con tal de determinar si la administración intravenosa del vector AAV9-GALNS era capaz de cumplir este objetivo, se administró dicho vector a la dosis de

1×10^{12} vg/ratón en ratones MPS IVA para valorar la expresión y la actividad GALNS en las diferentes regiones de huesos largos. Este estudio permitió demostrar que la administración sistémica del vector AAV9-GALNS era capaz de restablecer la expresión de *Galns* en las diferentes regiones de la tibia e incrementar, de forma estadísticamente significativa, los niveles de actividad GALNS en las diferentes regiones del fémur de ratones MPS IVA. Estos resultados indican que el incremento de actividad GALNS observada en el fémur de ratones MPS IVA tratados, puede ser debido tanto a la captación de la enzima GALNS circulante por parte del hueso, como a la propia expresión de *Galns* por parte de las células óseas transducidas. Este resultado demuestra que la aproximación terapéutica propuesta en esta tesis doctoral permitiría recuperar la expresión y la actividad GALNS en los huesos de pacientes Morquio A, pudiendo así contrarrestar las alteraciones óseas.

A nivel de tejidos somáticos, la administración intravenosa del vector AAV9-GALNS a la dosis de 1×10^{12} vg/ratón en ratones MPS IVA permitió un incremento significativo de la actividad GALNS en los diferentes órganos y tejidos periféricos de estos animales.

El hígado de ratones MPS IVA tratados con AAV9-GALNS alcanzaba niveles de actividad GALNS 25 veces superior a los valores de actividad observados en ratones WT. Este incremento de actividad GALNS se tradujo en una completa normalización del contenido de QS hepático y en una corrección del contenido de vesículas de acumulación observadas en el interior de las células de *Kupffer* de ratones MPS IVA. Además, en el corazón se observó que el tratamiento con AAV9-GALNS permitía incrementar aproximadamente 15 veces los niveles de actividad GALNS en ratones MPS IVA en comparación con la actividad obtenida en ratones WT. Al igual que en el hígado, el incremento de actividad GALNS en el corazón se tradujo en una completa corrección del contenido de vesículas de acumulación observada en las células subendocárdicas de las válvulas cardíacas. La corrección en el acúmulo de GAGs en las válvulas del corazón podría atenuar muchos de los problemas cardíacos observados en pacientes de Morquio A y que están asociados al engrosamiento de estas válvulas (Kampmann et al., 2016). Otro órgano en el que se observó una reducción en el contenido de QS fue en la tráquea de ratones MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS. La reducción en los niveles de QS en este órgano podría implicar una reducción de la mortalidad de estos pacientes, ya que las obstrucciones de la tráquea provocadas por el acúmulo de GAGs son una de las principales complicaciones que generan riesgo de muerte en los pacientes de Morquio A, debido a las apneas y complicaciones derivadas (Doherty et al., 2018; Tomatsu et al., 2016). Además, las alteraciones en este

órgano, sumadas a las posibles fusiones cervicales generan una gran dificultad a la hora de intubar a estos pacientes en intervenciones quirúrgicas (Theroux et al., 2012).

Otro tejido en el que se observó un elevado incremento de la actividad GALNS en ratones MPS IVA tratados con AAV9-GALNS fue el tejido adiposo. En este tejido se observó un incremento de actividad 44 veces superior en comparación con animales WT. A pesar de que el tejido adiposo no es uno de los tejidos más afectados en la enfermedad de Morquio A, juntamente con el hígado, son los órganos o tejidos periféricos con mayor potencial secretor de proteínas de gran tamaño, como es el caso de las enzimas lisosomales.

Finalmente, se observó que el incremento de actividad GALNS en los tejidos de ratones MPS IVA tratados con el vector terapéutico se correlacionaba con un incremento en la actividad enzimática circulante de estos animales, la cual se mantuvo en niveles estables, alcanzando valores 26 veces superiores a los observados en ratones WT 6 meses después de la administración del vector terapéutico. Además, se observó que el incremento de actividad GALNS a nivel circulante y en el resto de tejidos, se traducía en una completa normalización de los niveles de QS en el suero de ratones MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS. Este hecho corroboraba que una única administración sistémica del vector AAV9-GALNS daba lugar a niveles constantes y a largo plazo de producción de la proteína terapéutica, lo que sugiere que esta estrategia puede suponer probablemente un tratamiento de por vida, sin necesidad de realizarse re-administraciones.

En relación a la patología ocular observada en el ratón MPS IVA, el tratamiento con AAV9-GALNS también demostró eficacia terapéutica en la corrección del depósito de GAGs en la superficie del epitelio corneal y normalizó los niveles de QS en los alvéolos de las glándulas lagrimales de estos animales. El acúmulo de material extracelular en la superficie de la córnea contribuye a la aparición de la opacidad corneal observada en la mayoría de los pacientes de Morquio A (Hendriksz et al., 2013). Sin embargo, al contrario de lo observado en la córnea, nunca se había descrito la afectación de las glándulas lagrimales en pacientes de Morquio A. Dichas glándulas se encargan de la producción de las lágrimas, las cuales llevan a cabo funciones de limpieza y nutrición muy importantes a nivel corneal (Gipson et al., 2004). Es por esta razón por lo que alteraciones en estas glándulas podrían provocar un mal funcionamiento en la producción de lágrimas y de esta manera contribuir a la acumulación de material extracelular en el epitelio de la córnea. Estos resultados sugieren que la aproximación

de terapia génica descrita en este trabajo podría corregir la opacidad corneal observada en pacientes de Morquio A.

A nivel del SNC, se observó que la administración intravenosa del vector AAV9-GALNS permitió que el vector cruzase la BHE y proporcionase un incremento de la actividad GALNS entre 1,5 y 2 veces respecto a los valores obtenidos en ratones WT. Esta actividad incrementada en el SNC dio lugar a la normalización del contenido de QS en el cerebro y a la corrección en el contenido de vesículas de acumulación observadas en las células gliales perineuronales y endoteliales de la amígdala y en los macrófagos perineuronales y células endoteliales del giro dentado. Además de la patología de acumulación lisosomal, el tratamiento con AAV9-GALNS también permitió corregir la neuroinflamación observada en el córtex cerebral de ratones MPS IVA, revirtiendo la astrocitosis. A pesar de estar ampliamente descrito que la MPS IVA es una mucopolisacaridosis sin afección en el sistema nervioso central, se ha descrito que tanto el QS como el C6S presentan un papel fisiológico en el cerebro. Durante etapas fetales y neonatales, el QS participan en procesos de formación de conexiones axonales (Miller et al., 1997) y también está involucrado en procesos de reparación de daño axonal (Zhang et al., 2006). Se ha descrito que la inducción de lesiones en el encéfalo de ratones WT se traduce en un incremento en los niveles de QS en estas regiones y a su vez en el número de astrocitos reactivos (GFAP+) (Zhang et al., 2006). Esta función señalizadora del QS mediante su acúmulo en las regiones en las que se ha producido algún daño en el SNC podría ser la causante de la astrocitosis que se observa en los ratones MPS IVA. En los otros modelos de ratón de MPS IVA ya se había observado la afección del cerebro como parte de la patología de la enfermedad, observando material de depósito en diferentes regiones del encéfalo (Tomatsu et al., 2003, 2005, 2007). Además, se ha descrito un estudio *post-mortem* de un paciente de Morquio A con disminución de la actividad GALNS en el cerebro y con una neuropatía a nivel de la corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales y tálamo, similar a la reportada en otras MPSs como MPS I y MPS IIIB (Koto et al., 1978). Estudios más recientes en pacientes de Morquio A han revelado que éstos presentan una mayor tendencia a sufrir ansiedad, depresión y otras alteraciones del comportamiento tales como el déficit de atención (Davison et al., 2013). En estos mismos estudios se han observado alteraciones en diferentes regiones del cerebro, mediante resonancia magnética. Actualmente, no se conoce el mecanismo por el cual podrían darse estos déficits cognitivos, aunque se sabe que la acumulación de QS puede alterar diversas cascadas de señalización y otros procesos bioquímicos. Se hipotetiza que estos déficits neurocognitivos pueden estar

ligados a una alteración de la interacción entre los lisosomas, las mitocondrias y el tráfico de Ca^{2+} (Davison et al., 2013).

Estos resultados parecen sugerir que en contra de la creencia de que los pacientes de Morquio A conservan todas sus capacidades cognitivas, se pueden producir alteraciones en el SNC, las cuales sean responsables de algunos de los déficits cognitivos observados en este tipo de pacientes. En muchos casos, estos déficits han pasado desapercibidos, se han atribuido al hecho de sufrir una enfermedad crónica o a la falta de asistencia educacional debido a los largos períodos de hospitalización que sufren estos pacientes durante la infancia. Además, nuestros resultados sugieren que el SNC no debería estar completamente excluido de los órganos y tejidos que se estudian en pacientes de Morquio A, como se había considerado hasta ahora.

El elevado incremento suprafisiológico entre 44 y 1,5 veces de actividad GALNS en los tejidos somáticos y en el SNC, así como también en el suero de ratones MPS IVA tratados con el vector terapéutico, no supuso un problema de toxicidad derivada del aumento de actividad enzimática y degradación excesiva de QS y C6S. Esto es debido a que, como todas las hidrolasas ácidas lisosomales, la proteína GALNS únicamente se activa en el pH ácido que les ofrece el entorno lisosomal, mientras que en el pH sanguíneo o citosólico se encuentran inactivas (Geoffrey and Robert, 2000). Aún y así, dado los elevados niveles de actividad GALNS obtenidos, se requiere un estudio de dosis-respuesta. Este estudio permitiría encontrar la mínima dosis terapéutica necesaria para obtener una actividad enzimática suficiente como para observar efectos terapéuticos y corrección de la patología, tanto a nivel somático como del SNC. Esta dosis mínima no tiene porqué dar lugar a una actividad enzimática superior o igual a la observada en animales WT, ya que diversos estudios en diferentes LSDs sugieren la existencia de un *plateau* de actividad enzimática mínima, por encima del cual la enzima lisosomal es capaz de corregir la acumulación lisosomal patológica (Desnick, 2004; Donsante et al., 2007; Garcia et al., 2007). Este *plateau* se encuentra próximo al 10% de la actividad normal, tanto en cultivos celulares (Desnick, 2004) como en modelos murinos de MPS VII (Donsante et al., 2007), MPS II (Garcia et al., 2007) y en pacientes humanos de MPS IIIA con fenotipo leve (Valstar et al., 2010). La existencia de este *plateau* explicaría la evolución más lenta y el fenotipo menos severo que se observa en los pacientes con las variantes de MPS IVA de fenotipo atenuado (Montaño et al., 2007b) en los que la actividad GALNS residual sería capaz de hacer frente a la acumulación sostenida de GAGs lisosomales y atenuar la progresión de la patología.

De esta manera, el conjunto de resultados obtenidos en el modelo murino de MPS IVA, demostraron como la terapia génica puede ofrecer una alternativa para el tratamiento de la MPS IVA. La ventaja de esta aproximación reside en el hecho de que no hace falta una transducción del vector viral del 100% de las células afectadas, ya que gracias a los residuos de M6P, las enzimas lisosomales, como GALNS, pueden ser secretadas al riego sanguíneo y ser reconocidas por los M6PR de todas las células del organismo que expresen este receptor en su membrana plasmática, lo que permitiría la corrección de la patología en células que no han sido transducidas por el vector viral (Desnick and Schuchman, 2002). Además, a diferencia de las terapias basadas en el reemplazo enzimático, la terapia génica permite la transducción del SNC, permitiendo así la recuperación de la actividad de la enzima lisosomal en este sistema. Otra de las ventajas de la terapia génica reside en el hecho de que supone tratar a los pacientes una sola vez en la vida, a diferencia del tratamiento de por vida, con el elevado coste económico que ello conlleva, que ofrece la ERT. Sin embargo, uno de los inconvenientes de este tipo de terapias, basadas en la administración de la forma corregida de la proteína deficitaria (ya sea por ERT o por aproximaciones de terapia génica), es el rechazo de ésta en pacientes con mutaciones *missense*. En este caso, la proteína corregida podría exponer epítomos que el sistema inmunitario del paciente no reconocería como propios, y en consecuencia se podría generar una respuesta inmunitaria humoral contra la enzima lisosomal exógena. Esto podría provocar su eliminación del organismo, disminuyendo así los efectos terapéuticos.

La mayoría de pacientes de Morquio A nacen asintomáticos y en los casos de fenotipos más severos empiezan a desarrollar anormalidades esqueléticas entre el primer y tercer año de vida. Sin embargo, la edad media de diagnóstico se encuentra en los 4,7 años. (Montaño et al., 2007a).

En el contexto de intentar tratar a los pacientes a edades muy tempranas con el fin de poder detener el avance de la enfermedad antes de que ésta genere alteraciones irreparables, cabe destacar que la terapia en ratones MPS IVA se llevó a cabo en animales jóvenes, de 1 mes de edad que equivaldría a un ser humano de entre 2 y 12 años (Barrow, 2007). A esta edad, los ratones MPS IVA ya presentaban niveles de QS en hígado y suero muy superiores a los observados en ratones WT.

A pesar de que el tratamiento con el vector AAV9-GALNS en ratones MPS IVA de 1 mes de edad ha sido capaz de revertir la patología somática y del SNC observada en dicho modelo, no es posible llevar a cabo una predicción de los efectos de la terapia en

estos pacientes, en los cuales las alteraciones esqueléticas, somáticas y del SNC pueden encontrarse en estados más avanzados.

Uno de los principales inconvenientes de tratar a los pacientes a edades tempranas radica en el hecho de que los vectores AAV son vectores no integrativos, con lo que cuando la célula transducida se divide, se diluirá la expresión del transgén. En el estudio de biodistribución llevado a cabo en la presente tesis doctoral se observó que el principal órgano transducido por la administración sistémica del vector AAV9 era el hígado. Durante la infancia, este órgano presenta una tasa de crecimiento muy elevada y, por lo tanto, una tasa de división celular también muy elevada. Esta etapa de crecimiento del hígado coincide con la etapa de diagnóstico de las formas más severas de Morquio A (3-5 años) (Montaño et al., 2007a), provocando así que gran parte de la transducción hepática obtenida por la administración intravenosa del vector terapéutico se diluya. Con la finalidad de emular el escenario en el que se encontraría un paciente tratado a edades tempranas y que ha ido disminuyendo la expresión hepática de *Galns* con la edad, se realizó un estudio para restringir la expresión de *Galns* en este órgano. Por este motivo se trataron ratones MPS IVA con el vector AAV9-GALNS-MiRT, el cual presentaba la secuencia de reconocimiento del microRNA 122a (MiRT122a), específico de hígado. En este contexto se observó que la secuencia MiRT122a únicamente provocaba la pérdida significativa de expresión *Galns* en el hígado, llevando así a una disminución en la actividad GALNS hepática en comparación con los niveles de actividad GALNS en hígado obtenidos en ratones MPS IVA tratados con AAV9-GALNS. En el caso de los ratones MPS IVA tratados con el vector AAV9-GALNS-MiRT, la actividad GALNS observada únicamente pudo proceder de la GALNS que los hepatocitos fueron capaces de captar de circulación gracias a los M6PR presentes en su membrana plasmática. Además, el tratamiento de ratones MPS IVA con el vector AAV9-GALNS-MiRT no alteró de forma estadísticamente significativa la actividad GALNS en el suero ni en ninguno de los otros tejidos analizados, en comparación con la actividad obtenida en ratones MPS IVA tratados con AAV9-GALNS. Además, se observó que, al igual que el tratamiento con AAV9-GALNS, el tratamiento con AAV9-GALNS-MiRT era capaz de normalizar los niveles de QS en el suero de ratones MPS IVA en comparación con ratones WT.

Los resultados obtenidos en el estudio de restricción en la expresión hepática de *Galns*, refuerzan la importancia del uso de promotores ubicuos tales como el CAG, para permitir la expresión del transgén en todos los tejidos transducidos, permitiendo así que todos ellos puedan contribuir al mantenimiento de la actividad enzimática a largo plazo en todo el organismo.

Dado que el ratón MPS IVA utilizado en el desarrollo de la presente tesis doctoral no desarrolla la patología esquelética observada en los pacientes de Morquio A, no es posible determinar si la aproximación terapéutica desarrollada en este trabajo sería capaz de dar lugar a una reversión o mejoría del fenotipo esquelético. Sin embargo, en este trabajo se ha puesto de manifiesto el potencial terapéutico de la administración de vectores AAV9 codificantes para la proteína GALNS de forma sistémica, para corregir tanto la patología somática como neurológica de la MPS IVA.

VI. Conclusiones

1. Se ha generado un ratón *knock out* modelo de la MPS IVA con deficiencia de la enzima N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS). Dicho modelo no presentó actividad GALNS en ninguno de los tejidos analizados.
2. El ratón MPS IVA desarrolló las importantes alteraciones por acúmulo de glucosaminoglicanos (GAGs) a nivel somático, ocular y del SNC observadas en pacientes humanos. Sin embargo el ratón MPS IVA no desarrolló la patología esquelética descrita en estos pacientes
3. La administración sistémica de los vectores AAV8-GFP y AAV9-GFP demostró una amplia transducción de los hueso en el ratón MPS IVA y también de otros órganos y tejidos afectados en la enfermedad de Morquio A.
4. La administración intravenosa del vector AAV9-GALNS en ratones MPS IVA resultó en un incremento en la expresión y en la actividad enzimática GALNS en las diferentes regiones de los huesos largos.
5. El tratamiento con el vector viral AAV9-GALNS en ratones MPS IVA dio lugar a un incremento de la actividad GALNS a nivel somático, lo cual permitió la reversión de la acumulación de GAGs en tejidos muy afectados en los pacientes de Morquio A, como las válvulas del corazón y la tráquea.
6. Después de 6 meses tras la administración del vector AAV9-GALNS, los ratones MPS IVA tratados seguían mostrando niveles estables de actividad GALNS circulante.

7. El tratamiento con el vector viral AAV9-GALNS en ratones MPS IVA dio lugar a un incremento de la actividad GALNS en el cerebro, que permitió la corrección de la acumulación de queratán sulfato y la reversión de la neuroinflamación.

8. En resumen, los resultados observados en este trabajo permiten establecer las bases hacia la translacionabilidad de una estrategia de terapia génica basada en la administración intravenosa del vector viral AAV9-GALNS, para el tratamiento de la mucopolisacaridosis tipo IVA.

VII. Materiales y Métodos

1. MATERIALES

1.1. Animales

Para el desarrollo de esta tesis doctoral, se han generado ratones *knock-out* (KO) para el gen *Galns*. Este modelo se generó a partir de mESC obtenidas del *International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC, www.mousephenotype.org)*. Estas células presentaban un fondo genético C57BL/6N y eran KO totales para el gen *Galns*. La disrupción del gen *Galns* se llevó a cabo mediante recombinación homóloga del vector de recombinación PG00202_Z_1_F07 (Figura 12A) en la región intrónica entre el exón 2 y 3 del gen *Galns*. Este vector de recombinación ofreció al modelo potencial condicional, es decir la capacidad de poder pasar de KO total a KO específico de tejido.

Las mESC fueron microinyectadas en embriones en estadio de blastocisto obtenidos de hembras de 4-6 semanas de edad y con fondo genético C57BL/6J01aHsd. Los animales quimeras machos obtenidos a partir de estos embriones fueron cruzados con hembras C57BL/6Ntac y se obtuvieron 3 machos y 3 hembras heterocigotos para el KO en el gen *Galns*.

Los ratones se mantuvieron estabulados en instalaciones específicas libres de patógenos (SER-CBATEG), bajo condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C) y de iluminación (12 horas de luz y 12 de oscuridad, con encendido de luz a las 8 de la mañana), y con acceso libre a agua y comida (dieta estándar 2018S Teklad Global, Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EEUU).

En las instalaciones del SER-CBATEG se estableció la colonia de ratones KO para el gen *Galns* mediante cruces entre ratones heterocigotos para la mutación.

Ratones sanos y KO se utilizaron para los estudios preclínicos de biodistribución de los vectores virales AAV8-GFP y AAV9-GFP, y para los estudios de eficacia del tratamiento intravenoso del vector AAV9-GALNS.

El bienestar animal y los procedimientos experimentales fueron previamente evaluados, aprobados y autorizados por la Comisión de Ética en la Experimentación Animal y Humana de la UAB.

1.2. Cepas bacterianas

Para la obtención de los plásmidos desarrollados en la presente tesis doctoral, se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* XL2Blue (*Stratagene-Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EEUU). Los plásmidos contenían los genes de resistencia a ampicilina o kanamicina para su selección, por lo tanto, los cultivos bacterianos se podían hacer crecer en medios de cultivo LB (*Miller's LB Broth, Conda*, Madrid, España) suplementado con 50 µg/mL del antibiótico correspondiente. Cuando las condiciones experimentales requirieron de medio de cultivo sólido, se añadió un 2% de agar al medio.

1.3. Anticuerpos

Los anticuerpos detallados en la Tabla 16 fueron utilizados para la detección de proteínas mediante análisis inmunohistoquímicos.

Tabla 16. Listado de anticuerpos.

Anticuerpo	Huésped	Proveedor	Referencia
Anticuerpos primarios			
Anti-GFP	Cabra	<i>Abcam</i>	ab6673
Anti-Osteocalcin	Conejo	<i>Abcam</i>	ab93876
Anti-LAMP1	Rata	<i>Abcam</i>	ab25245
Anti-GFAP	Conejo	<i>DakoCytomation</i>	Z0334
Anticuerpos secundarios			
AlexaFluor488 anti-Goat IgG	Burro	<i>Life technologies</i>	A-11055
AlexaFluor568 anti-Rabbit IgG	Burro	<i>Life technologies</i>	A-10042
Biotinilated anti-Rabbit IgG	Cabra	<i>Pierce</i>	31820
Biotinilated anti-Rat IgG	Conejo	<i>DakoCytomation</i>	E0467

1.4. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este estudio, para el posterior desarrollo de vectores virales se detallan en la Tabla 17.

Tabla 17. Listado de plásmidos.

Plásmido	Promotor	Inserto	Señal de poliadenilación
pAAV-CAG-GFP-WPRE	CAG	GFP-WPRE	β -Globina de conejo
pAAV-CAG-omGALNS	CAG	GALNS murina optimizada	β -Globina de conejo
pAAV-CAG	CAG	-	β -Globina de conejo
pAAV-CAG-omGALNS-MiRT122a	CAG	GALNS murina optimizada - MiRT122a	β -Globina de conejo

El promotor CAG es un promotor híbrido formado por el potenciador intermedio/temprano del citomegalovirus (CMV) humano, el promotor de la β -actina de pollo y el primer intrón del gen de la β -globina humana. Permite expresar los genes de interés de forma ubicua y robusta.

La secuencia WPRE es una secuencia *hepadnaviridae* que ha sido utilizada ampliamente como elemento regulador, actuando en *cis*. Cuando la secuencia WPRE se encuentra en la región 3' no traducible del mRNA, potencia la expresión del transgén, incrementando los niveles de mRNA nucleares y citoplasmáticos (Zanta-Boussif et al., 2009).

El plásmido pAAV-CAG no contenía ningún gen y se utilizó para generar el vector Null.

1.5. Reactivos

Todos los reactivos de biología molecular utilizados para el desarrollo de la presente tesis doctoral se obtuvieron a partir de los fabricantes comerciales siguientes: *Abcam* (Cambridge, Reino Unido), *DakoCytomation* (Glostrup, Dinamarca), *Life Technologies* (Carlsbad, CA, EEUU), *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EEUU), *Panreac* (Barcelona, España), *Promega Corporation* (Madison, WI, EEUU), *Qiagen* (Hilden, Alemania), *New England Biolabs* (Ipswich, MA, EEUU), *Roche* (*Roche Diagnostics Corp*, IN, EEUU), *Fermentas* (St. Leon-Rot, Alemania), *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, EEUU), *Stratagene-Agilent technologies*, (Santa Clara, CA, EEUU), *Merck* (Darmstadt, Alemania), *Invitrogen* (Carlsbad, CA, EEUU), *Lucigen* (Middleton, WI, EEUU), *Bio-Rad Laboratories* (Hercules, CA, EEUU), *Toronto Research Chemicals* (Toronto, Canadá), *Vector Laboratories Ltd.* (Reino Unido), Laboratorios del Dr. Esteve (Barcelona, España), *Electron Microscopy Science* (Hatfield, PA, EEUU), *Millipore* (Burlington MA, EEUU).

2. MÉTODOS

2.1. Análisis del cariotipo de mESC

Los clones de mESC se descongelaron y cultivaron para analizar su morfología y capacidad de crecimiento. Para descartar anomalías cromosómicas, se realizó un análisis de cariotipo de cada uno de ellos. Las células se cultivaron en placas de 6 pozos sin fibroblastos a un 50-70% de confluencia. Tres horas antes de realizar el cariotipo se cambió el medio. Se añadió Demelcocine (*Sigma Aldrich D-1925*) 0.02 µg/mL para arrestar las células en metafase y se dejaron incubando 1 h a 37 °C. Después, las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS para resuspenderlas posteriormente en 1 mL KCl 0.56% (*Sigma Aldrich P-5405*). Tras 10 minutos a temperatura ambiente se realizaron 3 lavados con una mezcla de metanol/acético (3:1) (*Panreac 131091.1211, 131008.1611*), enfriado en hielo. Para obtener una buena dispersión de los cromosomas, la solución se depositó sobre un portaobjetos desde una altura aproximada de un metro. Posteriormente, se tiñeron con Giemsa 3% (*Sigma-Aldrich, Fluka 48900*) en PBS para su visualización. Se contó el número de cromosomas de un mínimo de 40 metafases/clon.

2.2. Técnicas de manipulación del DNA

2.2.1. Preparación del DNA plasmídico

Para la obtención de pequeñas cantidades de DNA plasmídico (3-4 µg) se realizaron *minipreparaciones (minipreps)* según el protocolo de lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979). A partir de 1.5 mL de medio de cultivo (LB + antibiótico) se degradó la pared bacteriana por acción de la enzima lisozima, seguida de una lisis alcalina y de la precipitación selectiva del DNA genómico y proteínas desnaturalizadas con una solución de acetato de potasio a pH ácido. El RNA bacteriano se degradó por la adición de la enzima RNasa.

Por otro lado, con tal de obtener grandes cantidades de DNA, se realizaron *maxipreparaciones (maxipreps)*, a partir de las cuales se obtiene como máximo 1 mg de plásmido, o *megapreparaciones (megapreps)* para obtener un máximo de 2.5 mg de plásmido, a partir de 200 o 500 mL de medio de cultivo respectivamente. El método está basado igualmente en la lisis alcalina, pero en este caso, la purificación del DNA se realizó mediante columnas de absorción *Pure Yield™ Plasmid MaxiPrep System*

(Promega Corporation) para las *maxipreps* y *EndoFree Plasmid Mega Kit* (Qiagen) para la *megapreps*.

2.2.2. Digestión del DNA con enzimas de restricción

Cada enzima de restricción requiere unas condiciones de reacción específicas de pH, fuerza iónica, temperatura y tiempo de digestión. En cada caso específico se siguieron las instrucciones de las diferentes casas comerciales utilizadas (*New England Biolabs, Roche o Fermentas*). En términos generales, el DNA se digirió con una unidad de enzima por μg de DNA, en el tampón suministrado por el fabricante, durante una hora a la temperatura óptima de cada enzima. El producto de la reacción se analizó en geles de agarosa. Cuando el DNA debía ser digerido por dos enzimas de restricción, las digestiones se llevaron a cabo conjuntamente siempre que las condiciones de tampón y temperatura fueran compatibles. Si las enzimas tenían requerimientos diferentes, después de la primera digestión, el DNA se purificaba de las sales y enzimas anteriores con el *kit GeneJET® Gel Extraction* (*ThermoScientific*) según las instrucciones del fabricante. Finalmente, el DNA se eluía en 30 μL de agua y seguidamente se digería con la segunda enzima de restricción.

2.2.3. Desfosforilación del fragmento de DNA

Una vez digerido, el DNA plasmídico se puede volver a religar. Este proceso se puede evitar mediante la eliminación de los residuos de fosfato del extremo 5' del vector. Para la desfosforilación se utilizó una unidad de fosfatasa alcalina (*FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas*) en su tampón comercial a 1x, por 1-5 μg de DNA. La reacción de desfosforilación se realizó durante 10 minutos a 37 °C. Posteriormente se inactivó la enzima a 75 °C durante 5 minutos para evitar cualquier reacción de la fosfatasa alcalina en la posterior reacción de ligación con el inserto.

2.2.4. Generación de extremos romos en fragmentos de DNA

En los casos en los que la digestión con la enzima de restricción produjo los extremos cohesivos y se necesitaban extremos romos para el clonaje, el fragmento digerido se trató con la enzima *Klenow Fragment* (*Fermentas*).

En presencia de la doble cadena de DNA y de deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), la DNA polimerasa rellena el extremo protuberante generado por la enzima de restricción (actividad polimerasa 5'→3' o 3'→5'). En ausencia de dNTPs, la enzima elimina el extremo 3' protuberante mediante su acción exonucleasa (3'→5') pero no tiene actividad exonucleasa 5'→3'. La reacción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

2.2.5. Ligación de fragmentos de DNA

La construcción de moléculas híbridas de DNA a partir de diferentes fragmentos es un procedimiento conocido como ligación y se lleva a cabo gracias a la acción de la enzima ligasa. Los fragmentos DNA de interés se mezclaron a distintas proporciones molares de vector:inserto con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (*New England Biolabs*) y el tampón correspondiente, según el protocolo establecido por el fabricante, suplementado con ATP durante 2-3h a temperatura ambiente. Los productos resultantes de la ligación se transformaron en células competentes *E. coli* de la cepa XL2-Blue (*Stratagene-Agilent technologies*, Santa Clara, CA, EEUU).

2.2.6. Transformación en células competentes *E. coli* XL2-Blue

Los plásmidos de DNA se introdujeron en células bacterianas eléctricamente competentes, mediante un proceso de transformación eléctrica o electroporación. Se utilizaron 40 µL de células *E. coli* XL2-Blue (2×10^{10} células/mL) previamente descongeladas en hielo, a las que se les añadió 1 µL (aproximadamente 10 ng) de la reacción de ligación del DNA o de DNA control. Después de una incubación en hielo durante 5 minutos, las células se electroporaron a 2500 V con un electroporador (*Bio-Rad*). Posteriormente, se diluyeron en 200 µL de medio LB precalentado a 37 °C y se sembraron en placas de LB con el antibiótico apropiado. Las células bacterianas se dejaron crecer a 37 °C durante toda la noche.

A la mañana siguiente se cultivaron las colonias de bacterias obtenidas y posteriormente se extrajo el DNA de éstas. Se identificó la presencia de moléculas híbridas de DNA mediante el uso de enzimas de restricción.

2.2.7. Purificación y resolución del DNA

Para la separación y purificación de los fragmentos de DNA se utilizó la electroforesis en geles de agarosa al 1% w/v. La visualización del DNA en el gel se consiguió mediante la adición de bajas concentraciones de bromuro de etidio al gel (0.5 µg/mL), un agente intercalante de DNA. Los diferentes fragmentos de DNA se visualizaron utilizando luz ultravioleta de baja longitud de onda (310 nm) mediante una cámara integrada en un transiluminador (*Syngene, Synoptics Ltd., Cambridge, Reino Unido*). Como marcador de tamaño molecular de DNA se utilizó el *GeneRuler 1 Kb* y el *GeneRuler 100 pb* (*Thermo Fisher Scientific*).

Los geles de agarosa se prepararon previamente, disolviendo agarosa en tampón de electroforesis 1x TAE (Tris-acetato 40 mM, pH 8.3 y EDTA 2mM) juntamente con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. Las muestras se cargaron en el gel con 1x de tampón de carga (*Thermo Fisher Scientific Scientific Inc., Waltham, MA, EEUU*) y se corrieron con el tampón de electroforesis 1x TAE a 90 V.

Cuando se hizo necesaria la extracción y purificación de algunos fragmentos de DNA separados, ésta se realizaba con el *kit* comercial *GeneJET™ Gel Extraction* (*Fermentas*). Finalmente, la cuantificación el DNA se llevaba a cabo en un espectrofotómetro *Nanodrop 1000 spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EEUU*).

2.3. Técnicas de obtención y manipulación del RNA

2.3.1. Aislamiento y purificación de RNA total

El RNA se obtuvo de los diferentes tejidos congelados a -80 °C en nitrógeno líquido justo después de la extracción. Se homogenizaron los tejidos congelados usando un politrón (*Polytron® MICCRA-KIT D-9, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mullheim, Alemania*) en 1 mL de reactivo de aislamiento, Tripure (Roche) para el hígado y el corazón y QIAzol (QIAGEN) para el tejido adiposo. A continuación, se siguió el protocolo comercial de purificación de RNA en columnas *Rneasy Mini Kit* (Cat.No.74104, QIAGEN) para extraer el RNA total.

Todas las muestras fueron tratadas con DNAsal (RNase-Free DNase Set, proporcionado con el kit, QIAGEN) en las columnas de purificación. Después de lavarse con los *buffers* suministrados por el fabricante, todas las muestras se eluyeron en 30

µL de agua destilada libre de RNAsas, menos las de hígado, que al contener gran cantidad de RNA se eluyeron en 50 µL. Finalmente, se determinó la concentración y pureza del RNA midiendo la absorbancia a 260 nm con espectrofotómetro *Nanodrop 1000 spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EEUU).

2.3.2. Síntesis de cDNA

Se sintetizó el cDNA a partir de 1 µg de RNA, retrotranscribiéndolo con el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como *primers* en la reacción se utilizaron *Oligo-dT* y hexámeros de oligonucleótidos en la presencia de *Protector RNase Inhibitor*, un inhibidor de RNAsas proporcionado en el *kit* comercial.

2.3.3. Cuantificación de la expresión de mRNA por PCR cuantitativa

Después de la retrotranscripción, el cDNA se diluyó 1/10 en agua Milli-Q para llevar a cabo la PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa (qPCR) es un método muy útil para el análisis de la expresión del mRNA de diversos genes. Se realizó qPCR para cuantificar la expresión de la versión optimizada del gen *Galns* en hígado, tejido adiposo, corazón y riñón, utilizando los *primers* indicados en la Tabla 18. La qPCR se realizó en el LightCycler® 480 (Roche) utilizando LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche).

Tabla 18. Listado de primers.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Rplp0</i>	5' TCCCACCTTGTCTCCAGTCT 3'	5' ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG 3'
<i>Galns</i> murina	5' TGTGGGAAGCAGACGACATT 3'	5' GCTGGTGGTGAAGAGATCCAT 3'
<i>Galns</i> murina optimizada	5' TCCCATCAACAGAAAGACC 3'	5' ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG 3'

Cada reacción de qPCR contenía 10 μ L de volumen total de mix (Tabla 19).

Tabla 19. Componentes de la reacción qPCR.

Reacción qPCR
5 μ l LightCycler® 480 Probe Master 2x
0.2 μ l <i>primer forward</i> (10 μ M)
0.2 μ l <i>primer reverse</i> (10 μ M)
2.6 μ l H ₂ O Milli-Q
2 μ l cDNA diluido 1/10

La reacción consistió en 5 min a 95 °C para una desnaturalización inicial y posteriormente 45 ciclos de 4 etapas: desnaturalización (10 s a 95 °C), *annealing* (10 s a 60 °C), amplificación (10 s a 72 °C) y 30 s a 60 °C. Antes de enfriar la reacción a 4 °C, se dejó 5 s a 95 °C y 1 min a 65 °C.

Los niveles de expresión de un gen se dan en Cts. Las Cts indican el número de ciclo al que la cantidad del cDNA del gen diana ha amplificado. Las Cts de las muestras de ensayo se ajustan a las Cts del gen normalizador, en este caso el gen *Rplp0*, para cada una de las muestras.

2.4. Construcción de plásmidos

Las estrategias de clonaje utilizadas para cada uno de los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 20.

Tabla 20. Estrategia de clonaje de los diferentes plásmidos.

Plásmido	Fuente
pAAV-CAG-GFP-WPRE	CBATEG
pAAV-CAG-omGALNS	Vector pAAV-CAG (CBATEG) Digerido con <i>MluI</i> y <i>EcoRI</i>
	Inserto pMA-RQ-omGALNS (<i>GeneArt Life Technologies</i>) Digerido con <i>MluI</i> y <i>EcoRI</i>
pAAV-CAG	Vector pAAV-CAG (CBATEG)
pAAV-CAG-omGALNS-MiRT122a	Vector pAAV-CAG-eGFP-MiRT122a (CBATEG) Digerido con <i>NotI</i> y <i>MluI</i>
	Inserto pMA-RQ-omGALNS (<i>GeneArt Life Technologies</i>) Digerido con <i>MluI</i> y <i>EcoRI</i>

2.4.1. Optimización de las secuencias de DNA

Previo a la construcción de los plásmidos con la versión optimizada de la secuencia murina del gen *Galns*, se diseñó la correspondiente secuencia codificante (CDS) optimizada. La optimización de secuencia (*GeneArt*®, *Life Technologies*) se llevó a cabo con el fin de maximizar la eficiencia de producción de la proteína GALNS murina en ratones. La optimización consistió en la eliminación de lugares de *splicing* críticos y de elementos desestabilizantes de secuencia de RNA, estabilizando así la secuencia de mRNA. Además, también se incluyeron elementos estabilizadores de RNA, optimización de uso de codón y del contenido en G/C, entre otros cambios, mediante un algoritmo desarrollado por *GeneArt*®.

2.4.2. Construcción del plásmido pAAV-CAG-omGALNS

La CDS del gen murino *Galns* fue utilizada como secuencia de partida (referencia NCBI: AF111346.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) y optimizada según se especifica anteriormente (apartado 2.4.1 de Materiales y Métodos). La CDS optimizada se recibió en el plásmido pMA-RQ (Amp^R), flanqueado por las dianas de restricción *MluI* y *EcoRI* en los extremos 5' y 3', respectivamente. Fue escindida del plásmido mediante la digestión doble *MluI/EcoRI* y posteriormente se clonó en el plásmido de expresión pAAV-CAG (Amp^R) aprovechando las mismas dianas de restricción. El plásmido resultante se nombró pAAV-CAG-omGALNS.

2.4.3. Construcción del plásmido pAAV-CAG-omGALNS-MiRT122a

En este caso, la estrategia de clonaje consistió en la sustitución del transgén *Gfp* del plásmido pAAV-CAG-eGFP-MiRT122a por el transgén *omGalns*, procedente del vector pMA-RQ-omGALNS. El transgén *Gfp* fue escindido del vector pAAV-CAG-eGFP-MiRT122a mediante la digestión doble *NotI/MluI* y fue substituido por el transgén *omGALNS*, procedente del vector pMA-RQ-omGALNS y que se obtuvo mediante la digestión doble *EcoRI/MluI*. La clonación fue semidirigida, por lo que hubo que hacer extremos romos mediante el uso de la enzima Klenow (*Fermentas*).

2.5. Producción, purificación y titulación de vectores virales adeno-asociados

2.5.1. Producción y purificación

Los vectores virales AAV8 y AAV9 de cadena simple se generaron en cultivos celulares HEK293 cultivados en *Roller Bottles* (RB) (*Greinner Bio-One*) mediante un protocolo de triple transfección (Ayuso et al., 2010a) que implica la utilización de 3 plásmidos (Figura 11). Este protocolo basado en la precipitación de los virus mediante polietilenglicol (PEG) y ultracentrifugación con gradientes de CsCl, permite eliminar prácticamente el contenido de cápsidas vacías y disminuir las impurezas proteicas, aumentando de esta manera la pureza de la preparación viral final, lo cual se traduce en un mayor nivel de transducción *in vivo* (Ayuso et al., 2010b).

Las células HEK293 se cultivaron hasta que alcanzaron el 80% de confluencia en medio DMEM suplementado con el 10% de FBS + 1% Penicilina/Estreptavidina. Entonces, cada RB se co-transfectó con 30 mL de fosfato cálcico con 150 µg de cada uno de los siguientes plásmidos: 1) los plásmidos pAAV-CAG-GFP-WPRE, pAAV-CAG-omGALNS, o pAAV-CAG, o pAAV-CAG-omGALNS-MiRT122a que contienen el transgén con el promotor de interés y la secuencia de polyA, flanqueado por las ITR, secuencias de DNA que permiten la encapsidación; 2) un plásmido auxiliar pREP/CAP que codifica para los genes AAV *Rep2* y *Cap8* o *Cap9* (según si se utiliza el plásmido con *Cap8* o *Cap9* se generan vectores AAV8 o AAV9 respectivamente); y 3) un plásmido auxiliar adenoviral denominado pAdHelper que contiene los genes codificantes para las funciones auxiliares de los adenovirus. Los plásmidos pREP/CAP9 y pAdHelper fueron obtenidos del laboratorio de la Dra. Katherine High, del *Children's Hospital of Philadelphia*, y el plásmido pREP/CAP8 fue obtenido del laboratorio del Dr. Federico Mingozzi de *Généthon*, Francia.

Tres días después de la co-transfección, se recogieron las células y se centrifugaron a 2.500 g durante 15 min a 4 °C. El medio se guardó a 4 °C y el pellet celular se reconstituyó en tampón TMS (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 8.0) y se sonicó para lisar las células y liberar los vectores de su interior. El lisado se centrifugó a 2.500 g durante 30 min y el sobrenadante resultante se añadió al medio de cultivo previamente guardado a 4 °C. A continuación, las partículas virales se precipitaron mediante una incubación de 15 h en PEG 8000 al 8% (*Sigma*) a 4 °C. Pasado dicho periodo, los vectores se precipitaron por centrifugación a 4000 g durante 30 min. El nuevo *pellet*, que contenía los vectores virales procedentes tanto del medio de cultivo como del lisado celular, se reconstituyó con TMS, se trató con benzonasa (*Merck*)

durante 1 h a 37 °C y finalmente se centrifugó a 10000 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se cargó en tubos de 37.5 mL *Ultra clear* (*Beckman*) que contenían un gradiente discontinuo de CsCl de densidad 1.5 g/mL (5 mL) y 1.3 g/mL (10 mL). A continuación, se centrifugaron a 27000 rpm durante 17 h en un rotor SW32T (*Beckman*). Las bandas que contenían los vectores (Figura 55) se recogieron con agujas de 18 G y se transfirieron a tubos *Ultra clear* de 12.5 mL. El resto del tubo de 12.5 mL se llenó con CsCl a 1.379 g/mL para generar un gradiente continuo (Figura 55). Estos tubos se centrifugaron a 38000 rpm en un rotor SW40Ti (*Beckman*) durante 48 h. Finalmente, los AAVs que encapsidaron el transgén se recogieron y dializaron con PBS + 0.001% Pluronic® F68 mediante una membrana de 10 kDa (*Slide-A-Lyzer Dialysis Products, Thermo Fisher Scientific*) y posteriormente se filtraron mediante filtros de 0.22 µm (*Millipore*).

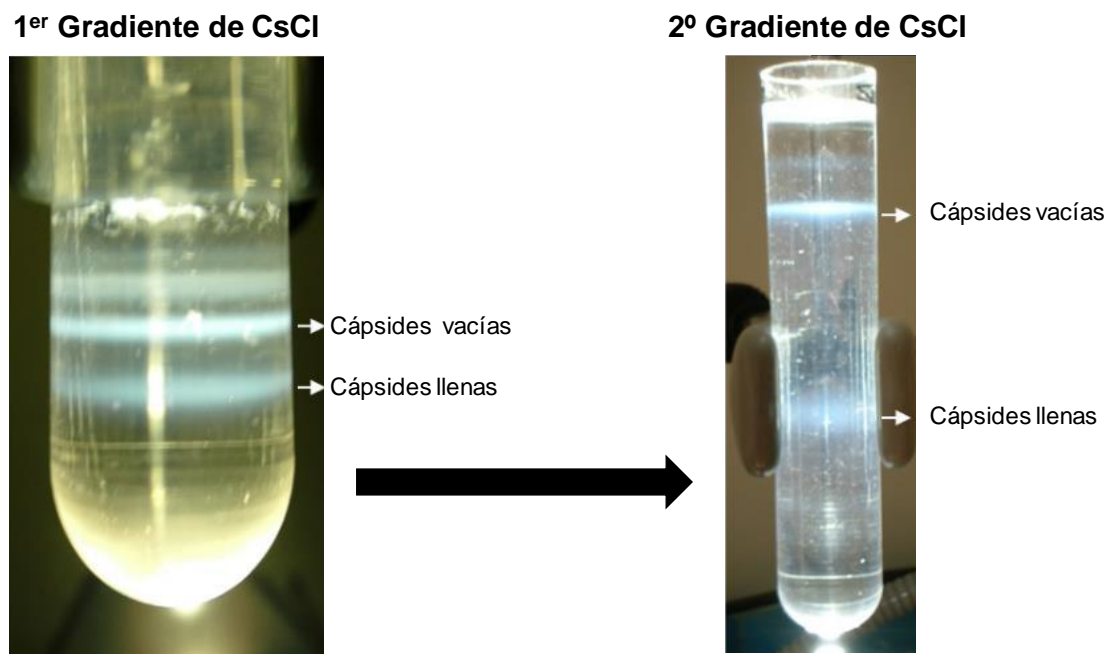


Figura 55. Purificación de los vectores AAVs. El primer gradiente de CsCl permite separar los vectores que contienen el transgén (cápsides llenas), de la mayor parte de impurezas y cápsides vacías. El segundo gradiente de CsCl permite separar las cápsides llenas, de impurezas de densidad similar a la de las cápsides llenas, de especies intermedias y de cápsides vacías. Adaptado de (Ayuso et al., 2010b).

2.5.2. Titulación de genomas virales

Los genomas virales de los AAV8 y AAV9 se determinaron por qPCR adecuando el protocolo descrito para AAV2, AAV8 y AAV9 *Reference Standard Material* (Lock et al., 2010) a los vectores usados en este estudio. La cuantificación de cada vector se realizó en paralelo con un vector de referencia de concentración conocida para garantizar la

validez de los resultados. Para la curva estándar se utilizó un plásmido linealizado y cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm.

Para garantizar que el título del vector viral no se sobreestimaba debido a la presencia de plásmidos de DNA sobrantes de la transfección durante la preparación viral final, se realizó un tratamiento con DNAsa previo a la cuantificación ya que sólo los genomas virales encapsidados son resistentes a dicha digestión.

Se añadieron 5 µL de cada preparación del vector viral a 5 µL de tampón de DNAsa 10x (130 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, pH 7.5), 1 µL de DNAsa (10 U/µL) y 36 µL de agua Milli-Q. La digestión se incubó 60 min a 37 °C. Posteriormente, las muestras se diluyeron para obtener un valor de amplificación dentro del rango de la curva estándar.

Cada reacción de qPCR contenía un volumen final de 10 µl (Tabla 21). La reacción consistió en una incubación inicial de 15 min a 95 °C (que permite la activación de la polimerasa y la desnaturalización de las cápsides virales, permitiendo la liberación de los genomas), seguida de 45 ciclos de 10 s a 95 °C (desnaturalización) y 30 s a 60 °C (*annealing* y elongación).

Tabla 21. Componentes de la reacción de qPCR.

Reacción qPCR
5 µl LightCycler® 480 Probe Master 2x
0.2 µl <i>primer forward</i> (10 µM)
0.2 µl <i>primer reverse</i> (10 µM)
0.1 µl sonda (10 µM)
2.5 µl H ₂ O Milli-Q
2 µl vector diluido

Los *primers* utilizados en la cuantificación de los genomas virales de los AAV hibridaban en la zona común del polyA (intrón β-globina de conejo):

- *Forward*: 5' CTT GAG CAT CTG ACT TCT GGC TAA T 3'
- *Reverse*: 5' GGA GAG GAG GAA AAA TCT GGC TAG 3'
- Sonda: 5' 6FAM- CCG AGT GAG AGA CAC AAA AAA TTC CAA CAC –BHQ1 3'

El título viral asignado para cada vector resultó de la media de tres cuantificaciones realizadas en días diferentes (Tabla 22).

Tabla 22. Título de genomas virales.

Vector viral	Título (vg/mL)
AAV8-GFP	4.40×10^{13}
AAV9-GFP	1.27×10^{14}
AAV9-GALNS	2.67×10^{13}
AAV9-Null	5.34×10^{13}
AAV9-GALNS-MiRT	6.00×10^{13}

2.5.3. Cuantificación de las partículas virales por tinción de plata

El análisis de las preparaciones virales por electroforesis de proteínas SDS-PAGE y la posterior tinción con nitrato de plata permite la cuantificación de las cápsides virales, que en comparación con el valor de genomas virales obtenidos por qPCR (ver apartado 2.5.2 de Materiales y Métodos), permite calcular el porcentaje de cápsides vacías en cada preparación (relación: partículas virales/genomas virales). Además, este método permite visualizar en el gel el grado de contaminación de proteínas no virales que podrían afectar la eficiencia de transducción *in vivo*.

Se mezcló el volumen apropiado del vector de interés, del vector de referencia (el mismo que se usó como control en la cuantificación por qPCR) y de diferentes diluciones del vector AAV-478 (de concentración conocida) con el tampón 4x *Novex® Tris-Glycine LDS Sample Buffer (Invitrogen)* y 10x *NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen)* hasta un volumen final de 20 µl. Tras 5 min de ebullición, las muestras se cargaron en un gel al 10% Bis-Tris Gel 1.5 mm de 15 pocillos (*Invitrogen*) y se corrieron a 120 V durante 2 h. Las proteínas del gel se fijaron con una mezcla de H₂O Milli-Q/etanol/ácido acético. A continuación, el gel se sensibilizó con una mezcla de Na₂S₂O₃/acetato sódico/etanol/H₂O Milli-Q. Finalmente, el gel se tiñó con nitrato de plata y las bandas se revelaron usando una mezcla de Na₂S₂O₃/formaldehído/H₂O Milli-Q (Figura 56).

AAV9-GALNS

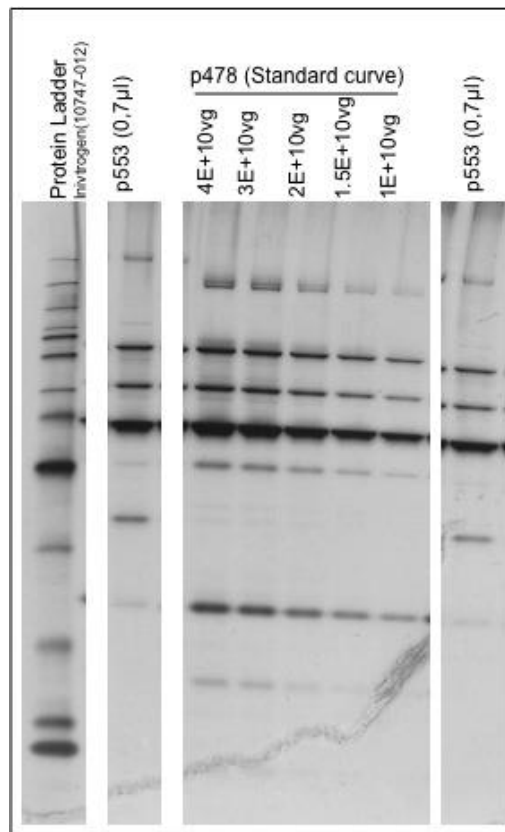


Figura 56. Imagen representativa de la cuantificación de partículas virales por tinción de plata. Cuantificación de las partículas virales por tinción de plata del vector AAV9-GALNS (p553) producido y utilizado en este trabajo.

El título de las partículas virales se obtuvo por densitometría. A partir de la intensidad de la VP3 de cada dilución del vector AAV-478 se generó una curva estándar para cuantificar las partículas virales de las diferentes preparaciones.

2.6. Genotipación de los ratones

Los ratones KO para el gen *Galns* fueron genotipados mediante análisis por PCR del DNA genómico obtenido de un fragmento de la cola. Ello permitió detectar la presencia de la inserción del gen reportero LacZ en la zona intrónica entre el exón 2 y 3 (Figura 12A).

2.6.1. Purificación de DNA genómico

La obtención del DNA genómico se hizo a partir de muestras de cola (~0.5 cm de longitud) de ratones de 3 – 4 semanas de edad, según una adaptación del método de extracción descrito por Wet y colaboradores (de Wet et al., 1987). Brevemente, los fragmentos de cola fueron digeridos *overnight* (*o/n*) a 56 °C en una solución tamponada suplementada con 0.1% w/v de proteinasa K (*Roche*) (100 mM Tris-HCl pH 8.5; 5 mM EDTA pH 8.0; 0.2% w/v SDS; 200 mM NaCl; 1 mg/mL proteinasa K). Esta incubación permitió la digestión tisular y la liberación del DNA genómico del interior celular. El homogeneizado (600 µl) fue centrifugado durante 5 min a 12000 g. El sobrenadante se separó y el DNA genómico se purificó por precipitación con 420 µl de isopropanol. Posteriormente se realizó una nueva centrifugación durante 15 min a 12000 g para favorecer la precipitación del DNA genómico al fondo del tubo. El sobrenadante se eliminó por aspiración y el *pellet* de DNA fue finalmente resuspendido en 800 µl de H₂O Milli-Q previamente calentada a 65 °C para facilitar la solubilización del DNA.

2.6.2. Genotipación por PCR

La genotipación se llevó a cabo utilizando el *kit* comercial de PCR *GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase kit* (*Promega*) en un volumen final de 15.7 µl (Tabla 23).

Tabla 23. Componentes de la reacción de PCR.

Reacción de PCR
3 µl 5x Green GoTaq® Flexi Buffer (Mg Free)
1.5 µl MgCl ₂ (25 mM)
0.3 µl dNTPs (25 mM)
0.3 µl <i>primer forward</i> (10 µM)
0.5 µl <i>primer reverse</i> (10 µM)
0.3 µl <i>primer reverse</i> KO (10 µM)
0.1 µl GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (5 U/µl)
8 µl H ₂ O Milli-Q
1.5 µl DNA genómico

La reacción consistía en una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C seguida de 45 ciclos con una desnaturalización (30 s a 95 °C), *annealing* (30 s a 61 °C) y elongación (15 s a 72 °C), y finalmente, una fase de elongación de 5 min a 72 °C.

Los *primers* utilizados en la genotipación fueron:

- *Forward*: 5' CCA GGG AAT GTC CCA CCT ATT T 3'
- *Reverse*: 5' GTC AGG TTG ACA CGA AGC TG 3'
- *Reverse KO*: 5' GGA ACT TCG GTT CCG GCG 3'

Los resultados de amplificación de esta reacción de PCR eran una banda de 153 pb para ratones MPS IVA, una doble banda de 427 pb y 153 pb para ratones heterocigotos y una banda de 427 pb para ratones WT (Figura 57B).

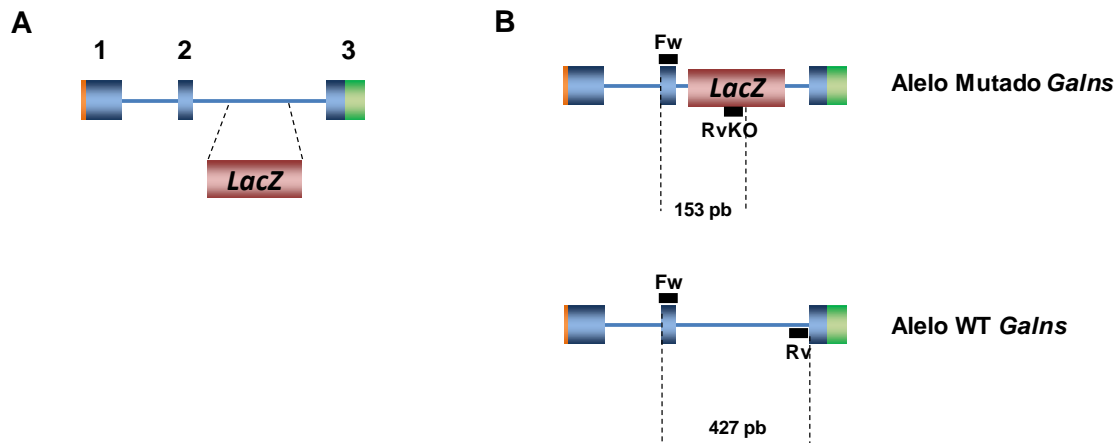


Figura 57. Genotipación del modelo murino de la MPS IVA. (A) Esquema de la interrupción del gen *Galns*. **(B)** Amplificación por PCR del gen *Galns* WT y mutado. El gen mutado da lugar a la amplificación de una banda de 153 pb, mientras que la banda correspondiente al alelo WT mide 427 pb. Fw: forward; Rv: Reverse; RvKO: reverse para detectar la mutación. Las cajas azules indican los exones del gen *Galns*. La caja roja indica el vector de recombinación utilizado para la interrupción del gen *Galns*.

Finalmente, el resultado de amplificación de la PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% w/v, y se visualizó en un transiluminador, como se especifica en el apartado 2.2.7 de Materiales y Métodos.

2.7. Administración intravenosa de vectores AAV

Previamente a la inyección, la cantidad necesaria de cada vector utilizado en este trabajo se diluyó en un volumen final de 200 µL con PBS + 0.001% Pluronic® F68

(*Gibco – Life Technologies*) y se administró por vía intravenosa (IV) en una de las venas caudales laterales del ratón, sin ejercer presión en el momento de la inyección. Antes de la administración, se expuso a los animales a luz infrarroja de 250 W (*Philips*) durante unos minutos para inducir vasodilatación y facilitar la visualización y acceso a la vena caudal. Para facilitar la inyección, se inmovilizó a los animales en un *restrainer* de metacrilato (*Harvard Apparatus*).

2.8. Obtención de muestras de suero de ratones

Desde la administración IV de los vectores hasta la eutanasia de los ratones, se realizaron extracciones periódicas de sangre a partir de los vasos de la cola. Para la obtención de sangre se cortó un pequeño fragmento de la cola y se recogieron entre 200 y 300 µl de sangre. Finalmente, la sangre se centrifugó a 1200 g durante 10 min a 8 °C para separar el suero, que se mantuvo a -80 °C hasta su análisis.

2.9. Eutanasia y obtención de muestras biológicas *post mortem* de ratones

En el momento de la eutanasia, los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de Ketamina (100 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg). A continuación, y bajo los efectos de la anestesia, se obtuvo sangre por punción intracardiaca del ventrículo izquierdo. Posteriormente, los animales se perfundieron también a través del ventrículo izquierdo, con 50 mL de PBS de forma controlada mediante el uso de una bomba dual de perfusión (Syringe Pump Dual CE 220V, *Leica biosystems*), para eliminar la sangre de los vasos sanguíneos de los diferentes tejidos y evitar así la posible interferencia en las posteriores determinaciones de la actividad GALNS. Una vez perfundidos, se procedió a la extracción de los diferentes órganos y tejidos. Todos los tejidos diseccionados se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento. Una parte de cada uno de los tejidos fue inmersa o/n en formaldehído (PFA) al 4% para realizar su posterior inclusión en bloques de parafina.

2.10. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford

Para cuantificar el contenido proteico, tanto de extractos celulares de cultivos HEK293 como de extractos de tejidos, se utilizó el método de Bradford (*Bio-Rad*). Este método está basado en el cambio de color del colorante *Comassie brilliant blue* cuando

se acompleja con proteínas. El cambio de coloración da lugar a un cambio en el máximo de absorbancia de 495 a 595 nm.

Para obtener los extractos proteicos, cada uno de los tejidos fueron homogeneizados en 0.5 mL de H₂O Milli-Q mediante sonicación (*Ultrasonic Processor Sonics & Materials Inc.*, CT, EEUU). En el caso de cultivos celulares, las células recogidas en cada uno de los 6 pozos de las placas, también fueron sonicados, aunque en 1 mL de H₂O Milli-Q. En el caso del fémur, la homogeneización se llevó a cabo en 1 mL de buffer de homogeneización (25 mM *Tris-HCl*, pH 7.2 y 1 mM *phenylmethylsulfonyl fluoride*) mediante disrupción mecánica del tejido (*Polytron® MICCRA-KIT D-9, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG*, Mülheim, Alemania). Una vez se obtuvieron los homogeneizados, se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante que ya contenía el extracto proteico.

El volumen apropiado de extracto proteico se diluyó en un volumen final de 800 µl de H₂O Milli-Q, a los cuales se les añadieron 200 µl del reactivo de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*). La misma reacción se llevó a cabo con diferentes cantidades (de 0 a 20 µg) de BSA (*Bovine Serum Albumin*) con tal de obtener la recta patrón. Después de la adición del reactivo de Bradford, las muestras se mezclaron y se dejaron incubar durante 5 min. La medición final de absorbancia se hizo a 595 nm en un espectrofotómetro Synergy HTX (*BioTek Instruments Inc.*).

2.11. Determinación de actividad GALNS

La actividad GALNS se determinó utilizando el sustrato fluorogénico comercial *4-Methylumbelliferyl β-D-Galactopyranoside-6-sulfate Sodium Salt (4-MU-βGal-6S.Na)* (*Toronto Research Chemicals*, Canadá) siguiendo las indicaciones de la casa comercial *Moscerdam Substrates* (Holanda) (van Diggelen et al., 1990). Brevemente, entre 0.1 – 10 µg de proteína total de los correspondientes extractos proteicos, o 2 – 5 µl de suero se incubaron durante 17 h a 37 °C juntamente con 20 µl de *4-MU-βGal-6S.Na*, 10 Mm. El sustrato se diluyó en el tampón indicado por la casa comercial (*Moscerdam Substrates*, Holanda) (0.1 M Na-acetato / 0.1 M ácido acético, pH 4.3, conteniendo 0.1 M NaCl + 0.02% (w/v) NaN₃ + 5 mM Pb-acetato (1.90 mg Pb-Ac 2.3 H₂O/mL). Esta incubación permite que la enzima GALNS catalice la desulfatación de la galactosamina del sustrato *4-MU-βGal-6S.Na* generando la especie intermedia *4-MU-βGa* la cual no es fluorogénica. Pasadas estas 17 h de incubación se añadió 5 µl de *Pi buffer* (0.9 M Na₂HPO₄ / 0.9 M NaH₂PO₄, pH 4.3 + 0.02% (w/v) Na-azida) y 10 µl de la enzima β-

Galactosidasa 10 U/mL diluida en BSA inactivado al 0.2% w/v (BSA inactivado por calor y pH + 0.02% NaN₃) a la reacción y se realizó una segunda incubación de 2 h a 37 °C. En esta segunda incubación la enzima β-Galactosidasa cataliza la hidrólisis de 4-MU-βGa permitiendo la liberación del producto 4-MU el cual sí que es fluorogénico. Una vez finalizada la segunda incubación, la reacción enzimática se paró con la adición de 200 µl de tampón *stop* alcalino (0.5 M NaHCO₃ / 0.5 M Na₂CO₃, pH 10.7 + 0.025% de Tritón X-100) y la fluorescencia emitida se midió en un fluorímetro Synergy HTX (*BioTek Instruments Inc.*) utilizando un filtro de excitación 360/40 nm y un filtro de emisión 460/40 nm. La actividad GALNS se calculó por extrapolación de la fluorescencia detectada con una recta patrón generada mediante diluciones seriadas de 4-MU (4-MethylUmbelliferone, *Sigma*), y se normalizó por la cantidad de proteína total cargada (ver apartado 2.10).

2.12. Determinación del contenido de GAGs

Para la cuantificación del contenido de GAGs se utilizó la técnica de espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS). Entre 10 y 50 mg de tejido congelado se digirieron o/n a 56 °C en agua Milli-Q suplementada con 1 mg/ml de proteinasa K. Después de 10 minutos de inactivación de la proteinasa K a 90 °C, las digestiones se centrifugaron 10 min a 10000 g. El sobrenadante se filtró (*Ultrafree, MC, Millipore*) por centrifugación (5 min, 12000 g).

Para la cuantificación de queratán sulfato, el filtrado se digirió con Keratanasa II a 40 °C durante 3h. Tras la digestión se obtuvieron 2 disacáridos: Galβ1-4GlcNAc(6S) y Gal(6S)β1-4GlcNAc(6S), que derivan del queratán sulfato. LAcNAc *(S1) y LAcNAc* (S2) se utilizaron como estándares internos.

Para la cuantificación de condroitín sulfato el filtrado se digirió con Condroitinasa ABC a 37 °C durante 3h. Tras la digestión se obtuvieron 2 disacáridos: C4S y C6S, que derivan de los condroitines. La condrosina se utilizó como estándar interno.

Una vez realizada la digestión, las moléculas grandes tales como las proteínas, se eliminaron mediante centrifugación a través de un filtro de 10000 NMWL. La separación cromatográfica de los disacáridos y de los estándares internos se realizó mediante cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC). La detección se realizó por ionización negativa por *electrospray-MS/MS* utilizando el modo de adquisición MRM. Las áreas de los picos de cada analito se integraron y la relación de áreas respecto al estándar interno

se interpoló en la curva de calibración preparada con los patrones de los disacáridos para obtener su concentración.

2.13. Inmunohistoquímica de secciones tisulares en bloques de parafina

Tras la extracción, los tejidos se mantuvieron en formol al 4% durante 12 – 24 h a 4 °C, fueron incluidos en bloques de parafina y finalmente se hicieron cortes histológicos con un microtomo *Leica RM2135* (*Leica Biosystems*, Barcelona, España). En el caso de los huesos, previo a la generación del bloque de parafina, las muestras se sometieron a un proceso de descalcificación de 3 semanas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disuelto en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4). Una vez desparafinadas, las secciones tisulares se incubaron o/n a 4 °C con los anticuerpos primarios específicos (ver apartado 1.3). Se hicieron 3 lavados con PBS de 5 min y finalmente se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario (ver apartado 1.3) durante 1 h a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo con el reactivo *ABC Complex* (*Vector Laboratories Ltd.*, Reino Unido), el cual utiliza 3.3'-diaminobenzidina como cromógeno. Las imágenes en campo claro se obtuvieron con un microscopio óptico *Eclipse 90i* (*Nikon Instruments Inc.*, Tokio, Japón) y las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un microscopio confocal *Olympus Fluoview 1000* (*Olympus Corporation*, Tokio, Japón).

2.14. Tinción de Mowry de secciones de ojos en bloques de parafina

Tras la extracción, los ojos se mantuvieron en formol al 4% durante 12 h a 4 °C, fueron incluidos en bloques de parafina y finalmente se hicieron cortes histológicos con un micrótopo *Leica RM2135* (*Leica Biosystems*, Barcelona, España). Las secciones tisulares se incubaron 10 min con una solución acuosa de cloruro férrico 39% disuelto en ácido acético 12%. Se hicieron 4 lavados con ácido acético 12% de 3 min y finalmente se añadió la solución de ferrocianuro clorhídrico (ferrocianuro potásico 2% + ácido clorhídrico 2%) durante 20 min. Finalmente, las secciones se lavaron con 5 min de agua corriente y se diferenciaron los núcleos con una incubación de 3 min con rojo nuclear. Las imágenes en campo claro se obtuvieron con un microscopio óptico *Eclipse 90i* (*Nikon Instruments Inc.*, Tokio, Japón).

2.15. Tinción *In-toto* con X-gal

Tras la eutanasia, los cerebros se diseccionaron y se fijaron en PFA 4% durante 1.5 h. Posteriormente se incubaron protegidos de la luz a 37 °C en solución X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside) [0.4 mg/mL X-gal (Sigma), 200 mM ferrocianuro de potasio, 1 M MgCl₂ diluido en PBS]. Secciones coronales del cerebro fueron incubadas durante 4 h, mientras que la sección sagital fue incubada o/n. Para parar la reacción, los tejidos fueron sometidos a 2 lavados con PBS. Los tejidos se conservaron en formalina al 10% a 4 °C. Las imágenes de los tejidos se obtuvieron con un microscopio óptico SMZ1000 (*Nikon Instruments Inc.*, Tokio, Japón).

2.16. Determinación del área positiva en inmunohistoquímica y tinciones en campo claro

Para cuantificar la señal positiva de los análisis inmunohistoquímicos en tejidos contra LAMP-1 y GFAP y en la tinción de Mowry, se utilizó el programa *NIS Elements Advanced Research 2.20* (*Nikon Instruments*). El porcentaje de área con marcaje positivo se calculó como área positiva (en píxeles) de cada marcaje en relación al área total de la imagen o al área total del epitelio de la córnea en el caso de las tinciones realizadas en este último.

2.17. Microscopia electrónica de transmisión

Los ratones fueron eutanasiados por sobredosis de isoflurano (*Isofluo*, Laboratorios del Dr. Esteve, Barcelona, España) y posteriormente perfundidos con 1 mL de glutaraldehído al 2.5% y PFA al 2% a través de la vena cava inferior. Una pequeña porción de cada tejido se diseccionó e incubó a 4 °C durante 2 h en el mismo fijador utilizado durante la perfusión. Después de varios lavados con tampón fosfato sódico (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄) frío, los tejidos se fijaron con tetraóxido de osmio al 1%, se marcaron con acetato de uranilo. Finalmente se deshidrataron mediante soluciones seriadas de etanol y se incluyeron en resina *epoxi*. Secciones ultrafinas de los bloques de resina (600 – 800 Å) se marcaron con citrato de plomo y se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión H-7000 (*Hitachi*, Tokio, Japón).

2.18. Tinción *Toluidine-Blue* en secciones semifinas

Secciones semifinas de los bloques de resina *epoxi* (800 nm) (ver apartado 2.17) se tiñeron durante 30 s con azul de *toluidina* (*Electron Microscopy Science*) disuelto en agua Milli-Q en presencia de tetraborato sódico.

2.19. Análisis de la fluorescencia específica de GFP

El análisis de fluorescencia específica de GFP se realizó a partir de extractos proteicos de diferentes tejidos, procedentes de animales inyectados con AAV8-GFP y AAV9-GFP.

Para obtener los extractos proteicos, cada uno de los tejidos fue homogeneizado en 1 mL de tampón de lisis (50 mM Tris, 1% Nonident p40, 0.25% deoxicolato de sodio, 150 mM NaCl y 1 mM EDTA en PBS, pH 7.4) mediante disrupción mecánica del tejido (*Polytron® MICCRA-KIT D-9, ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Mülheim, Alemania*). Una vez se obtuvieron los homogeneizados, se centrifugaron a 10500 rpm durante 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante que ya contenía el extracto proteico. La fluorescencia emitida se midió en un fluorímetro Synergy HTX (*BioTek Instruments Inc.*) utilizando una excitación de 488 nm y una emisión de 512 nm. Las unidades relativas de fluorescencia (RFUs) se normalizaron por la cantidad de proteína total cargada (ver apartado 2.10).

2.20. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm erros estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante el análisis de la variancia de un factor (ANOVA), y las comparaciones múltiples entre grupos control y de tratamiento se realizaron con el post-test de *Dunnet*. La significancia estadística se determinó cuando $p < 0.05$. El método de *Kaplan-Meier* se utilizó para el cálculo de la supervivencia, y el *log-rank test*, para las respectivas comparaciones múltiples.

VIII. Bibliografía

Akiyama, T. (2014). MPS IV prevalence (Japan).

Al-Jasmi, F.A., Tawfig, N., Berniah, A., Ali, B.R., Taleb, M., Hertecant, J.L., Bastaki, F., and Souid, A.-K. (2013). Prevalence and Novel Mutations of Lysosomal Storage Disorders in United Arab Emirates : LSD in UAE. *JIMD Rep.* 10, 1–9.

Aldenhoven, M., Jones, S.A., Bonney, D., Borrill, R.E., Coussons, M., Mercer, J., Bierings, M.B., Versluys, B., van Hasselt, P.M., Wijburg, F.A., et al. (2015). Hematopoietic Cell Transplantation for Mucopolysaccharidosis Patients Is Safe and Effective: Results after Implementation of International Guidelines. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 21, 1106–1109.

Alejandra, H., Velásquez, O., Leonardi, F., Soto, C., Rodríguez, A., Lizaraso, L., Mosquera, Á., Bohórquez, J., Coronado, A., Espejo, Á., et al. (2013). Effect of culture conditions and signal peptide on production of human recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in *Escherichia coli* BL21. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 689–698.

Alméciga-Díaz, C., Rueda-Páramo, M.A., Echeverri, O.Y., Montaña, A.M., Tomatsu, S., and Barrera, L.A.I. (2009). Uso de vectores derivados de virus adenoasociados para el tratamiento de la enfermedad de Morquio A. *Univ. Médica Bogotá* 50, 356–379.

Alméciga-Díaz, C., Montaña, A.M., Tomatsu, S., and Barrera, L.A. (2010). Adeno-associated virus gene transfer in Morquio A disease - Effect of promoters and sulfatase-modifying factor 1. *FEBS J.* 277, 3608–3619.

Alméciga-Díaz, C., Montaña, A., Tomatsu, S., and Barrera, L. (2012). Contribución colombiana al conocimiento de la enfermedad de Morquio A.

Alméciga-Díaz, C., Cuaspa, R., Herrera, J., Barbosa, H., and Barrera, L. (2013). New viral vectors for Morquio syndrome type A gene therapy. *Mol. Genet. Metab.* 108, S19.

Alméciga-Díaz, C., A Hidalgo, O., Olarte-Avellaneda, S., and Rodríguez-Lopez, A. (2018). Characterization of two potential pharmacological chaperones for N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfates (GALNS) enzyme. *Mol. Genet. Metab.* 123.

Amunts, K., Kedo, O., Kindler, M., Pieperhoff, P., Mohlberg, H., Shah, N.J., Habel, U., Schneider, F., and Zilles, K. (2005). Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: Intersubject variability and probability maps. In *Anatomy and Embryology*, pp. 343–352.

Applegarth, D.A., Toone, J.R., and Lowry, R. (s. a. R.B. (2000). Incidence of Inborn Errors of Metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics* 105, e10–e10.

Aronovich, E.L., Bell, J.B., Khan, S.A., Belur, L.R., Gunther, R., Koniar, B., Schachern, P.A., Parker, J.B., Carlson, C.S., Whitley, C.B., et al. (2009). Systemic correction of storage disease in MPS I NOD/SCID mice using the sleeping beauty transposon system. *Mol. Ther.* 17, 1136–1144.

Ashworth, J.L., Biswas, S., Wraith, E., and Lloyd, I.C. (2006). Mucopolysaccharidoses and the eye. *Surv. Ophthalmol.* 51, 1–17.

Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-associated defective virus particle. *Science* 149, 754–756.

Ayuso, E., Mingozzi, F., and Bosch, F. (2010a). Production, Purification and Characterization of Adeno-Associated Vectors. *Curr. Gene Ther.* 10, 423–436.

- Ayuso, E., Mingozi, F., Montane, J., Leon, X., Anguela, X.M., Haurigot, V., Edmonson, S.A., Africa, L., Zhou, S., High, K.A., et al. (2010b). High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther.* 17, 503–510.
- Baehner, F., Schmiedeskamp, C., Krummenauer, F., Miebach, E., Bajbouj, M., Whybra, C., Kohlschütter, A., Kampmann, C., and Beck, M. (2005). Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 1011–1017.
- Bainbridge, J.W.B., Mehat, M.S., Sundaram, V., Robbie, S.J., Barker, S.E., Ripamonti, C., Georgiadis, A., Mowat, F.M., Beattie, S.G., Gardner, P.J., et al. (2015). Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 372, 1887–1897.
- Baldo, G., Mayer, F.Q., Martinelli, B., Meyer, F.S., Burin, M., Meurer, L., Tavares, A.M.V., Giugliani, R., and Matte, U. (2012). Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-l-iduronidase partially corrects visceral pathology in mucopolysaccharidosis type i mice. *Cytotherapy* 14, 860–867.
- Bali, D.S., Goldstein, J.L., Banugaria, S., Dai, J., Mackey, J., Rehder, C., and Kishnani, P.S. (2012). Predicting cross-reactive immunological material (CRIM) status in Pompe disease using GAA mutations: lessons learned from 10 years of clinical laboratory testing experience. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 160C, 40–49.
- Ballock, R.T., and O'Keefe, R.J. (2003). The biology of the growth plate. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85–A, 715–726.
- Barranger, J.A., and Cabrera-Salazar, M.A. (2007). *Lysosomal storage disorders* (Boston, MA: Springer US).
- Barrow, P.C. (2007). Toxicology Testing for Products Intended for Pediatric Populations. In *Nonclinical Drug Safety Assessment Practical Considerations for Successful Registration*, (Washington, DC), pp. 411–440.
- Bathe, M., Rutledge, G.C., Grodzinsky, A.J., and Tidor, B. (2005). Osmotic pressure of aqueous chondroitin sulfate solution: A molecular modeling investigation. *Biophys. J.* 89, 2357–2371.
- Bayliss, M.T., Osborne, D., Woodhouse, S., and Davidson, C. (1999). Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage: The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. *J. Biol. Chem.* 274, 15892–15900.
- Berrier, K.L., Kazi, Z.B., Prater, S.N., Bali, D.S., Goldstein, J., Stefanescu, M.C., Rehder, C.W., Botha, E.G., Ellaway, C., Bhattacharya, K., et al. (2015). CRIM-negative infantile Pompe disease: characterization of immune responses in patients treated with ERT monotherapy. *Genet. Med.* 17, 912–918.
- Bettelheim, F.A., and Plessy, B. (1975). The hydration of proteoglycans of bovine cornea. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 381, 203–214.
- Bevan, A.K., Duque, S., Foust, K.D., Morales, P.R., Braun, L., Schmelzer, L., Chan, C.M., McCrate, M., Chicoine, L.G., Coley, B.D., et al. (2011). Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol. Ther.* 19, 1971–1980.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.

- Boldrini, M., Santiago, A.N., Hen, R., Dwork, A.J., Rosoklija, G.B., Tamir, H., Arango, V., and John Mann, J. (2013). Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology* 38, 1068–1077.
- Buchlis, G., Podsakoff, G.M., Radu, A., Hawk, S.M., Flake, A.W., Mingozi, F., and High, K.A. (2012). Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood* 119, 3038–3041.
- Burton, B.K., Berger, K.I., Lewis, G.D., Tarnopolsky, M., Treadwell, M., Mitchell, J.J., Muschol, N., Jones, S.A., Sutton, V.R., Pastores, G.M., et al. (2015). Safety and physiological effects of two different doses of elosulfase alfa in patients with morquio a syndrome: A randomized, double-blind, pilot study. *Am. J. Med. Genet. Part A* 167, 2272–2281.
- Byers, S., Vaidyanathan, S., L.K, A., and S.A, D.-R. (2018). Chondrogenesis and osteogenesis are delayed by MPS IVA keratan sulphate but not normal keratan sulphate. *Mol. Genet. Metab.* 123, 174.
- Caciotti, A., Garman, S.C., Rivera-Colón, Y., Procopio, E., Catarzi, S., Ferri, L., Guido, C., Martelli, P., Parini, R., Antuzzi, D., et al. (2011). GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: an update on genetic alterations and clinical findings. *Biochim Biophys Acta* 1812, 782–790.
- Capitão, L., Sampaio, A., Fernández, M., Sousa, N., Pinheiro, A., and Gonçalves, Ó.F. (2011). Williams syndrome hypersociability: A neuropsychological study of the amygdala and prefrontal cortex hypotheses. *Res. Dev. Disabil.* 32, 1169–1179.
- Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M.A., Xu, C., Mason, W.S., Moloshok, T., Bort, R., et al. (2004). miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol.* 1, 106–113.
- Cheng, S.H., and Smith, A.E. (2003). Gene therapy progress and prospects: Gene therapy of lysosomal storage disorders. *Gene Ther.* 10, 1275–1281.
- Chinen, Y., Higa, T., Tomatsu, S., Suzuki, Y., Orii, T., and Hyakuna, N. (2014). Long-term therapeutic efficacy of allogenic bone marrow transplantation in a patient with mucopolysaccharidosis IVA. *Mol. Genet. Metab. Reports* 1, 31–41.
- Chuang, C.K., Lin, H.Y., Wang, T.J., Huang, S.F., and Lin, S.P. (2017). Bio-Plex immunoassay measuring the quantity of lysosomal N-acetylgalactosamine-6-sulfatase protein in dried blood spots for the screening of mucopolysaccharidosis IVA in newborn: A pilot study. *BMJ Open* 7, e014410.
- Ciberer (2016). Desarrollo de medicamentos huérfanos para enfermedades raras. 12.
- Cimaz, R., Vijay, S., Haase, C., Coppa, G.V., Bruni, S., Wraith, E., and Guffon, N. (2006). Attenuated type I mucopolysaccharidosis in the differential diagnosis of juvenile idiopathic arthritis: A series of 13 patients with Scheie syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 24, 196–202.
- Cimaz, R., and La Torre, F. (2014). Mucopolysaccharidoses. *Curr. Rheumatol. Rep.* 16, 389.
- Clària, J., and Titos, E. (2004). La célula de kupffer. *Gastroenterol. Hepatol.* 27, 264–273.

- Cosma, M.P., Pepe, S., Annunziata, I., Newbold, R.F., Grompe, M., Parenti, G., and Ballabio, A. (2003). The Multiple Sulfatase Deficiency Gene Encodes an Essential and Limiting Factor for the Activity of Sulfatases the turnover and degradation of sulfated compounds, mostly complex molecules that are hydrolyzed in lyso- somes in concert with acidic glycosida. *Cell* 113, 445–456.
- Danes, B.S. (1973). Corneal clouding in the genetic mucopolysaccharidoses: A cell culture study. *Clin. Genet.* 4, 1–7.
- Davison, J.E., Kearney, S., Horton, J., Foster, K., Peet, A.C., and Hendriksz, C.J. (2013). Intellectual and neurological functioning in Morquio syndrome (MPS IVa). *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 323–328.
- Daya, S., and Berns, K.I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 583–593.
- Desnick, R.J., and Schuchman, E.H. (2002). Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat. Rev. Genet.* 3, 954–966.
- Desnick, R.J. (2004). Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27, 385–410.
- van Diggelen, O.P., Zhao, H., Kleijer, W.J., Janse, H.C., Poorthuis, B.J.H.M., van Pelt, J., Kamerling, J.P., and Galjaard, H. (1990). A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A (MPS IV A). *Clin. Chim. Acta* 187, 131–139.
- Disbrow, G.L., Sunitha, I., Baker, C.C., Hanover, J., and Schlegel, R. (2003). Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression. *Virology* 311, 105–114.
- Doherty, C., Averill, L.W., Theroux, M., Mackenzie, W.G., Pizarro, C., Mason, R.W., and Tomatsu, S. (2018). Natural history of Morquio A patient with tracheal obstruction from birth to death. *Mol. Genet. Metab. Reports* 14.
- Donida, B., Marchetti, D.P., Biancini, G.B., Deon, M., Manini, P.R., da Rosa, H.T., Moura, D.J., Saffi, J., Bender, F., Burin, M.G., et al. (2015). Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 1012–1019.
- Donsante, A., Levy, B., Vogler, C., and Sands, M.S. (2007). Clinical response to persistent, low-level beta-glucuronidase expression in the murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30, 227–238.
- Düng, V.C., Tomatsu, S., Montañó, A.M., Gottesman, G., Bober, M.B., Mackenzie, W., Maeda, M., Mitchell, G.A., Suzuki, Y., and Orii, T. (2013). Mucopolysaccharidosis IVA: correlation between genotype, phenotype and keratan sulfate levels. *Mol Genet Metab* 110, 129–138.
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.A., and Barkats, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol. Ther.* 17, 1187–1196.
- de Duve, C. (2005). The lysosome turns fifty. *Nat. Cell Biol.* 7, 847–849.

- Dvorak-Ewell, M., Wendt, D., Hague, C., Christianson, T., Koppaka, V., Crippen, D., Kakkis, E., and Vellard, M. (2010). Enzyme replacement in a human model of mucopolysaccharidosis IVA in vitro and its biodistribution in the cartilage of wild type mice. *PLoS One* 5.
- Enns, G.M., and Huhn, S.L. (2008). Central nervous system therapy for lysosomal storage disorders. *Neurosurg. Focus* 24, E12.
- Ferrier, D.R. (2014). *Biochemistry* (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).
- Flanagan, M., Gana, Q., Emmett, R., Akel, S., and Montaña, A. (2018). Improvement of enzyme activity in vitro of galns deficient fibroblasts by umbilical mesenchymal stem cell-mediated microvesicles. In *WorldSymposium*, (San Diego), pp. 48–49.
- Fukuda, S., Tomatsu, S., Masue, M., Sukegawa, K., Iwata, H., Ogawa, T., Nakashima, Y., Hori, T., Yamagishi, A., Hanyu, Y., et al. (1992). Mucopolysaccharidosis type IVA: N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase exonic point mutations in classical morquio and mild cases. *J. Clin. Invest.* 90, 1049–1053.
- Fukuda, S., Tomatsu, S., Masuno, M., Ogawa, T., Yamagishi, A., Maruf Rezvi, G.M., Sukegawa, K., Shimosawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., et al. (1996). Mucopolysaccharidosis IVA: Submicroscopic deletion of 16q24.3 and a novel R386C mutation of n-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene in a classical Morquio disease. *Hum. Mutat.* 7, 123–134.
- Fuller, M., Meikle, P.J., and Hopwood, J.J. (2006). *Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview* (Oxford PharmaGenesis).
- Futerman, A.H., and van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 554–565.
- Gaffen, J.D., Gleave, S.J., Crossman, M. V., Bayliss, M.T., and Mason, R.M. (1995). Articular cartilage proteoglycans in osteoarthritic STR/Ort mice. *Osteoarthr. Cartil.* 3, 95–104.
- Gao, G.-P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11854–11859.
- Gao, G., Vandenberghe, L., and Wilson, J. (2005). New Recombinant Serotypes of AAV Vectors. *Curr. Gene Ther.* 5, 285–297.
- Garcia, A.R., DaCosta, J.M., Pan, J., Muenzer, J., and Lamsa, J.C. (2007). Preclinical dose ranging studies for enzyme replacement therapy with idursulfase in a knock-out mouse model of MPS II. *Mol. Genet. Metab.* 91, 183–190.
- Geisler, A., and Fechner, H. (2016). MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy. *World J. Exp. Med.* 6, 37.
- Geoffrey, M., and Robert, E. (2000). *The cell: a molecular approach*. Bost. Univ. Sunderl. 689.
- Gipson, I., Joyce, N., and Zieske, J. (2004). The anatomy and cell biology of the human cornea, limbus, conjunctiva and adnexa. In: Smolin G, Foster CS, Azar DT, Dohlman CH. *Smolin and Thoft's The Cornea: Scientific Foundations and Clinical Practice*.
- Giugliani, R. (2014). MPS IV prevalence (Brazil).

- Glossl, J., Truppe, W., and Kresse, H. (1979). Purification and Properties of N-Acetylgalactosamine 6-Sulphate Sulphatase from Human Placenta. *Biochem. J* 181, 37–46.
- Grimm, D., Lee, J.S., Wang, L., Desai, T., Akache, B., Storm, T.A., and Kay, M.A. (2008). In Vitro and In Vivo Gene Therapy Vector Evolution via Multispecies Interbreeding and Retargeting of Adeno-Associated Viruses. *J. Virol.* 82, 5887–5911.
- Gutiérrez, M.A., García-Vallejo, F., Tomatsu, S., Cerón, F., Alméciga-Díaz, C.J., Domínguez, M.C., and Barrera, L.A. (2008). Construction of an adenoassociated, viral derived, expression vector to correct the genetic defect in Morquio A disease | Construcción de un vector de expresión derivado de virus adenoasociados para corregir in vitro el defecto genético de la enfermedad d. *Biomedica* 28, 448–459.
- Harmatz, P.R., Mengel, K.E., Giugliani, R., Valayannopoulos, V., Lin, S.-P., Parini, R., Guffon, N., Burton, B.K., Hendriksz, C.J., Mitchell, J.J., et al. (2014). Longitudinal analysis of endurance and respiratory function from a natural history study of Morquio A syndrome. *Mol. Genet. Metab.* 114, 186–194.
- Heimer, R., Sporer, R., Molinaro, L., Hansen, L., and Laposata, E. (1992). Normal human synovial fluid and articular cartilage contain similar intact proteoglycans. *Lab. Invest.* 66, 701–707.
- Hendriksz, C.J., Harmatz, P., Beck, M., Jones, S., Wood, T., Lachman, R., Gravance, C.G., Orii, T., and Tomatsu, S. (2013a). Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. *Mol. Genet. Metab.* 110, 54–64.
- Hendriksz, C.J., Al-Jawad, M., Berger, K.I., Hawley, S.M., Lawrence, R., Mc Ardle, C., Summers, C.G., Wright, E., and Braunlin, E. (2013b). Clinical overview and treatment options for non-skeletal manifestations of mucopolysaccharidosis type IVA. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 309–322.
- Hendriksz, C.J., Burton, B., Fleming, T.R., Harmatz, P., Hughes, D., Jones, S.A., Lin, S.P., Mengel, E., Scarpa, M., Valayannopoulos, V., et al. (2014). Efficacy and safety of enzyme replacement therapy with BMN 110 (elosulfase alfa) for Morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA): a phase 3 randomised placebo-controlled study. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 979–990.
- Hendriksz, C.J., Giugliani, R., Harmatz, P., Mengel, E., Guffon, N., Valayannopoulos, V., Parini, R., Hughes, D.A., Pastores, G.M., Lau, H.A., et al. (2015). Multi-domain impact of elosulfase alfa in Morquio A syndrome in the pivotal phase III trial. *Mol. Genet. Metab.* 114, 178–185.
- Hille-Rehfeld, A. (1995). Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1241, 177–194.
- Hintze, J.P., Tomatsu, S., Fujii, T., Montañó, A.M., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Fukushi, M., Ishimaru, T., and Orii, T. (2011). Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry and sandwich ELISA for determination of keratan sulfate in plasma and urine. *Biomark. Insights* 6, 69–78.
- Hoggan, M.D., Blacklow, N.R., and Rowe, W.P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55, 1467–1474.

Im, D.S., and Muzyczka, N. (1992). Partial Purification of Adeno-Associated Virus Rep78, Rep52, and Rep40 and Their Biochemical Characterization. *J. Virol.* 66, 1119–1128.

International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs (ICORD) (2012). The Yukiwariso Declaration. 101, 805–807.

James, A., Hendriksz, C.J., and Addison, O. (2012). The oral health needs of children, adolescents and young adults affected by a mucopolysaccharide disorder. *JIMD Rep* 2, 51–58.

Jawaid, A., Schmolck, H., and Schulz, P.E. (2008). Hypersociability in Williams syndrome: A role for the amygdala? *Cogn. Neuropsychiatry* 13, 338–342.

Jimenez, V., Muñoz, S., Casana, E., Mallol, C., Elias, I., Jambrina, C., Ribera, A., Ferre, T., Franckhauser, S., and Bosch, F. (2013). In vivo adeno-associated viral vector-mediated genetic engineering of white and brown adipose tissue in adult mice. *Diabetes* 62, 4012–4022.

Jomphe, C., Gabriac, M., Hale, T.M., Héroux, L., Trudeau, L.-E., Deblois, D., Montell, E., Vergés, J., and du Souich, P. (2008). Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102, 59–65.

Jones, S.A., Bialer, M., Parini, R., Martin, K., Wang, H., Yang, K., Shaywitz, A.J., and Harmatz, P. (2015). Safety and clinical activity of elosulfase alfa in pediatric patients with Morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA) less than 5 y. *Pediatr. Res.* 78, 717–722.

Kakkis, E.D., McEntee, M.F., Schmidtchen, A., Neufeld, E.F., Ward, D.A., Gompf, R.E., Kania, S., Bedolla, C., Chien, S.L., and Shull, R.M. (1996). Long-term and high-dose trials of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I. *Biochem. Mol. Med.* 58, 156–167.

Kakkis, E.D., Schuchman, E., He, X., Wan, Q., Kania, S., Wiemelt, S., Hasson, C.W., O'Malley, T., Weil, M.A., Aguirre, G.A., et al. (2001). Enzyme replacement therapy in feline mucopolysaccharidosis I. *Mol. Genet. Metab.* 72, 199–208.

Kampmann, C., Abu-Tair, T., Gökce, S., Lampe, C., Reinke, J., Mengel, E., Hennermann, J.B., and Wiethoff, C.M. (2016). Heart and cardiovascular involvement in patients with mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio-A Syndrome). *PLoS One* 11.

Kelly, E.J., and Russell, S.J. (2009). MicroRNAs and the regulation of vector tropism. *Mol. Ther.* 17, 409–416.

Khaliq, T., Sadilek, M., Scott, C.R., Turecek, F., and Gelb, M.H. (2011). Tandem Mass Spectrometry for the Direct Assay of Lysosomal Enzymes in Dried Blood Spots: Application to Screening Newborns for Mucopolysaccharidosis IVA. *Clin. Chem.* 57, 128–131.

Kleijer, W.J., Geilen, G.C., Garritsen, V., Huijmans, J.G.M., Los, F.J., Voznyi, Y. V., and van Diggelen, O.P. (2000). First-trimester diagnosis of Morquio disease type A. *Prenat. Diagn.* 20, 183–185.

Koto, A., Horwitz, A.L., Suzuki, K., and Tiffany, C.W. (1978). The Morquio syndrome: neuropathology and biochemistry. *Ann. Neurol.* 4, 26–36.

- Kubaski, F., Tomatsu, S., Patel, P., Shimada, T., Xie, L., Yasuda, E., Mason, R., Mackenzie, W.G., Theroux, M., Bober, M.B., et al. (2015). Non-invasive pulmonary function test on Morquio patients. *Mol. Genet. Metab.* 115, 186–192.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735–739.
- Lai, Y., Yue, Y., and Duan, D. (2010). Evidence for the failure of adeno-associated virus serotype 5 to package a viral genome ≥ 8.2 kb. *Mol. Ther.* 18, 75–79.
- Latif, N., Sarathchandra, P., Taylor, P.M., Antoniow, J., and Yacoub, M.H. (2005). Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. *J. Heart Valve Dis.* 14, 218–227.
- Lentz, T.B., Gray, S.J., and Samulski, R.J. (2012). Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol. Dis.* 48, 179–188.
- Leone, A., Rigante, D., Amato, D.Z., Casale, R., Pedone, L., Magarelli, N., and Colosimo, C. (2015). Spinal involvement in mucopolysaccharidoses: a review. *Child's Nerv. Syst.* 31, 203–212.
- Leone, P., Shera, D., McPhee, S.W.J., Francis, J.S., Kolodny, E.H., Bilaniuk, L.T., Wang, D.-J., Assadi, M., Goldfarb, O., Goldman, H.W., et al. (2012). Long-Term Follow-Up After Gene Therapy for Canavan Disease.
- Li, Y., Liu, Y., Xia, W., Lei, D., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2013). Age-dependent alterations of decorin glycosaminoglycans in human skin. *Sci. Rep.* 3.
- Lin, H.-Y., Lin, S.-P., Chuang, C.-K., Niu, D.-M., Chen, M.-R., Tsai, F.-J., Chao, M.-C., Chiu, P.-C., Lin, S.-J., Tsai, L.-P., et al. (2009). Incidence of the mucopolysaccharidoses in Taiwan, 1984-2004. *Am. J. Med. Genet. Part A* 149A, 960–964.
- Lock, M., McGorray, S., Auricchio, A., Ayuso, E., Beecham, E.J., Blouin-Tavel, V., Bosch, F., Bose, M., Byrne, B.J., Caton, T., et al. (2010). Characterization of a Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Reference Standard Material. *Hum. Gene Ther.* 21, 1273–1285.
- Manno, C.S., Arruda, V.R., Pierce, G.F., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* 12, 342–347.
- Mashima, R., Ohira, M., Okuyama, T., and Tatsumi, A. (2018). Quantification of the enzyme activities of iduronate-2-sulfatase, N-acetylgalactosamine-6-sulfatase and N-acetylgalactosamine-4-sulfatase using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol. Genet. Metab. Reports* 14, 36–40.
- Matern, D., Gavrilov, D., Oglesbee, D., Raymond, K., Rinaldo, P., and Tortorelli, S. (2015). Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Semin. Perinatol.* 39, 206–216.
- McCarty, D.M., Young, S.M., and Samulski, R.J. (2004). Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors. *Annu. Rev. Genet.* 38, 819–845.
- Meikle, P.J. (2004). Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders: Clinical Evaluation of a Two-Tier Strategy. *Pediatrics* 114, 909–916.

- Mejía, M.J.H. (2012). Uso de vectores lentivirales para mediar la transfección del gen de la enzima n-acetil-galactosamina -6-sulfato-sulfatasa en células en cultivo. Pontificia Universidad Javeriana.
- Miller, B., Sheppard, A.M., and Pearlman, A.L. (1997). Developmental expression of keratan sulfate-like immunoreactivity distinguishes thalamic nuclei and cortical domains. *J. Comp. Neurol.* 380, 533–552.
- Miller, D.G., Rutledge, E.A., and Russell, D.W. (2002). Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat. Genet.* 30, 147–148.
- Minami, R., Katsuyuki, A., Tooru, K., Satosi, T., Kazuhiko, O., and Tooru, N. (1979). Identification of keratan sulfate in liver affected by morquio syndrome. *Clin. Chim. Acta* 93, 207–213.
- Mingozzi, F., Meulenbergh, J.J., Hui, D.J., Basner-Tschakarjan, E., Hasbrouck, N.C., Edmonson, S.A., Hutnick, N.A., Betts, M.R., Kastelein, J.J., Stroes, E.S., et al. (2009). AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* 114, 2077–2086.
- Mingozzi, F., and High, K.A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 12, 341–355.
- Miyamoto, T., Ishii, K., Asaka, R., Suzuki, A., Takatsu, A., Kashima, H., and Shiozawa, T. (2011). Immunohistochemical expression of keratan sulfate: a possible diagnostic marker for carcinomas of the female genital tract. *J. Clin. Pathol.* 64, 1058–1063.
- Moldave, K. (2001). *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Academic Press).
- Montaño, A.M., Tomatsu, S., Gottesman, G.S., Smith, M., and Orii, T. (2007a). International Morquio A Registry: Clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30, 165–174.
- Montaño, A.M., Sukegawa, K., Kato, Z., Carozzo, R., Di Natale, P., Christensen, E., Orii, K.O., Orii, T., Kondo, N., and Tomatsu, S. (2007b). Effect of “attenuated” mutations in mucopolysaccharidosis IVA on molecular phenotypes of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30, 758–767.
- Morquio, L. (1929). Sur une forme de dystrophie osseuse familiale. *Arch. Médecine Des Enfants* 32, 129–135.
- Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327–334.
- Morrone, A., Caciotti, A., Atwood, R., Davidson, K., Du, C., Francis-Lyon, P., Harmatz, P., Mealiffe, M., Mooney, S., Oron, T.R., et al. (2014). Morquio a syndrome-associated mutations: A review of alterations in the GALNS gene and a new locus-specific database. *Hum. Mutat.* 35, 1271–1279.
- Moscatello, D.K., Santra, M., Mann, D.M., McQuillan, D.J., Wong, A.J., and Iozzo, R.V. (1998). Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 101, 406–412.
- Mossman, J., and Patrick, A.D. (1982). Prenatal diagnosis of mucopolysaccharidosis by two-dimensional electrophoresis of amniotic fluid glycosaminoglycans. *Prenat. Diagn.* 2, 169–176.

- Mourão, P.A.S. (1988). Distribution of chondroitin 4–sulfate and chondroitin 6–sulfate in human articular and growth cartilage. *Arthritis Rheum.* 31, 1028–1033.
- Muenzer, J. (2011). Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology* 50.
- Nakai, H., Montini, E., Fuess, S., Storm, T.A., Meuse, L., Finegold, M., Grompe, M., and Kay, M.A. (2003). Helper-independent and AAV-ITR-independent chromosomal integration of double-stranded linear DNA vectors in mice. *Mol. Ther.* 7, 101–111.
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526, 351–360.
- Nash, K., Chen, W., and Muzyczka, N. (2008). Complete In Vitro Reconstitution of Adeno-Associated Virus DNA Replication Requires the Minichromosome Maintenance Complex Proteins. *J. Virol.* 82, 1458–1464.
- Nathwani, A.C., Rosales, C., McIntosh, J., Rastegarlar, G., Nathwani, D., Raj, D., Nawathe, S., Waddington, S.N., Bronson, R., Jackson, S., et al. (2011). Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol. Ther.* 19, 876–885.
- Nelson, J., Broadhead, D., and Mossman, J. (1988). Clinical findings in 12 patients with MPS IV A (Morquio's disease): Further evidence for heterogeneity. Part I: Clinical and biochemical findings. *Clin. Genet.* 33, 111–120.
- Nelson, J. (1997). Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum. Genet.* 101, 355–358.
- Nelson, J., Crowhurst, J., Carey, B., and Greed, L. (2003). Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. *Am. J. Med. Genet.* 123A, 310–313.
- Neufeld, E.F., and Muenzer, J. (2001). The Mucopolysaccharidoses. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver CR, ed. (New York), pp. 3421–3452.
- Olarte-Avellaneda, S., Rodríguez-López, A., Alméciga-Díaz, C.J., and Barrera, L.A. (2014). Computational analysis of human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase enzyme: an update in genotype–phenotype correlation for Morquio A. *Mol. Biol. Rep.* 41, 7073–7088.
- Osborn, M.J., McElmurry, R.T., Lees, C.J., Defeo, A.P., Chen, Z.Y., Kay, M.A., Naldini, L., Freeman, G., Tolar, J., and Blazar, B.R. (2011). Minicircle DNA-based gene therapy coupled with immune modulation permits long-term expression of α -L-iduronidase in mice with mucopolysaccharidosis type i. *Mol. Ther.* 19, 450–460.
- Pajares, S., Alcalde, C., Couce, M.L., Del Toro, M., González-Meneses, A., Guillén, E., Pineda, M., Pintos, G., Gort, L., and Coll, M.J. (2012). Molecular analysis of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A) in Spain. *Mol. Genet. Metab.* 106, 196–201.
- Pizarro, C., Davies, R.R., Theroux, M., Spurrier, E.A., Averill, L.W., and Tomatsu, S. (2016). Surgical Reconstruction for Severe Tracheal Obstruction in Morquio A Syndrome. *Ann. Thorac. Surg.* 102, e329–e331.
- Platt, F.M., Boland, B., and van der Spoel, A.C. (2012). Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *J. Cell Biol.* 199, 723–734.
- Poorthuis, B., Wevers, R., Kleijer, W., Groener, J., de Jong, J., van Weely, S., Niezen-Koning, K., and van Diggelen, O. (1999). The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum. Genet.* 105, 151–156.

Prevalence of Rare Diseases: Bibliographic Data. Orphanet Report Series June (2017).
Prevalence and incidence of rare diseases : Bibliographic data.

Pshezhetsky, A. V, and Potier, M. (1996). Association of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase with the multienzyme lysosomal complex of beta-galactosidase, cathepsin A, and neuraminidase. Possible implication for intralysosomal catabolism of keratan sulfate. *J. Biol. Chem.* 271, 28359–28365.

Qubbaj, W., Al-Aqeel, A.I., Al-Hassnan, Z., Al-Duraim, A., Awartani, K., Al-Rejjal, R., and Coskun, S. (2008). Preimplantation genetic diagnosis of Morquio disease. *Prenat. Diagn.* 28, 900–903.

Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R.J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.* 76, 791–801.

Rastall, D.P., and Amalfitano, A. (2015). Recent advances in gene therapy for lysosomal storage disorders.

Reitman L, M., and Kornfeld, S. (1981). UDP-N-Acetylglucosamine: Glycoprotein N-Acetylglucosamine-1- phosphotransferase.

Rivera-Colón, Y., Schutsky, E.K., Kita, A.Z., and Garman, S.C. (2012). The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A. *J. Mol. Biol.* 423, 736–751.

Roca, A., and Castañeda, G. (2005). Metabolismo óseo en fisiología endocrina. In *Fisiología Endocrina*, (Bogotá), p.

Rodríguez-López, A., Alméciga-Díaz, C.J., Sánchez, J., Moreno, J., Beltran, L., Díaz, D., Pardo, A., Ramírez, A.M., Espejo-Mojica, A.J., Pimentel, L., et al. (2016). Recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Sci. Rep.* 6.

Rowan, D.J., Tomatsu, S., Grubb, J.H., Montañó, A.M., and Sly, W.S. (2013). Assessment of bone dysplasia by micro-CT and glycosaminoglycan levels in mouse models for mucopolysaccharidosis type I, IIIA, IVA, and VII. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 235–246.

Ruzo, A., Marcó, S., García, M., Villacampa, P., Ribera, A., Ayuso, E., Maggioni, L., Mingozi, F., Haurigot, V., and Bosch, F. (2012b). Correction of Pathological Accumulation of Glycosaminoglycans in Central Nervous System and Peripheral Tissues of MPSIIIA Mice through Systemic AAV9 Gene Transfer. *Hum. Gene Ther.* 23, 1237–1246.

Ruzo, A., Garcia, M., Ribera, A., Villacampa, P., Haurigot, V., Marcó, S., Ayuso, E., Anguela, X.M., Roca, C., Agudo, J., et al. (2012a). Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol. Ther.* 20, 254–266.

Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 623–635.

Saika, S., Miyamoto, T., Tanaka, S., Tanaka, T., Ishida, I., Ohnishi, Y., Ooshima, A., Ishiwata, T., Asano, G., Chikama, T., et al. (2003). Response of lens epithelial cells to injury: role of lumican in epithelial-mesenchymal transition. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2094–2102.

- Salazar, D.A., Rodríguez-López, A., Herreño, A., Barbosa, H., Herrera, J., Ardila, A., Barreto, G.E., González, J., and Alméciga-Díaz, C.J. (2016). Systems biology study of mucopolysaccharidosis using a human metabolic reconstruction network. *Mol. Genet. Metab.* 117, 129–139.
- Samulski, R.J., Berns, K.I., Tan, M., and Muzyczka, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 2077–2081.
- Samulski, R.J., Chang, L.S., and Shenk, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.* 63, 3822–3828.
- Sands, M.S. (2011). AAV-mediated liver-directed gene therapy. *Methods Mol. Biol.* 807, 141–157.
- Sanford, M., and Lo, J.H. (2014). Elosulfase alfa: First global approval. *Drugs* 74, 713–718.
- Saraiva, J., Nobre, R.J., and Pereira de Almeida, L. (2016). Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. *J. Control. Release* 241, 94–109.
- Sawamoto, K., Suzuki, Y., Mackenzie, W.G., Theroux, M.C., Pizarro, C., Yabe, H., Orii, K.E., Mason, R.W., Orii, T., and Tomatsu, S. (2016). Current therapies for Morquio A syndrome and their clinical outcomes. *Expert Opin. Orphan Drugs* 4, 941–951.
- Sawamoto, K., Chen, H.H., Alméciga-Díaz, C.J., Mason, R.W., and Tomatsu, S. (2017). Gene therapy for Mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* 123, 59–68.
- Schiffmann, R., Fitzgibbon, E.J., Harris, C., DeVile, C., Davies, E.H., Abel, L., van Schaik, I.N., Benko, W., Timmons, M., Ries, M., et al. (2008). Randomized, controlled trial of miglustat in Gaucher's disease type 3. *Ann. Neurol.* 64, 514–522.
- Schnepp, B.C., Jensen, R.L., Chen, C.-L., Johnson, P.R., and Clark, K.R. (2005). Characterization of Adeno-Associated Virus Genomes Isolated from Human Tissues. *J. Virol.* 79, 14793–14803.
- Schueler, U.H., Kolter, T., Kaneski, C.R., Zirzow, G.C., Sandhoff, K., and Brady, R.O. (2004). Correlation between enzyme activity and substrate storage in a cell culture model system for Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27, 649–658.
- Schultz, B.R., and Chamberlain, J.S. (2008). Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol. Ther.* 16, 1189–1199.
- Schweighardt, B., Tompkins, T., Lau, K., Jesaitis, L., Qi, Y., Musson, D.G., Farmer, P., Haller, C., Shaywitz, A.J., Yang, K., et al. (2015). Immunogenicity of Elosulfase Alfa, an Enzyme Replacement Therapy in Patients with Morquio A Syndrome: Results from MOR-004, a Phase III Trial. *Clin. Ther.* 37, 1012–1021.e6.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 283–296.
- Shapiro, F., and Forriol, F. (2005). Growth cartilage: developmental biology and biomechanics. In *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, (Elsevier Doyma), pp. 338–345.

- Shimada, T., Tomatsu, S., Yasuda, E., Mason, R.W., Mackenzie, W.G., Shibata, Y., Kubaski, F., Giugliani, R., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., et al. (2014). Chondroitin 6-sulfate as a novel biomarker for mucopolysaccharidosis IVA and VII. *JIMD Rep.* 16, 15–24.
- Shimada, T., Tomatsu, S., Mason, R.W., Yasuda, E., Mackenzie, W.G., Hossain, J., Shibata, Y., Montaña, A.M., Kubaski, F., Giugliani, R., et al. (2015). Di-sulfated Keratan Sulfate as a Novel Biomarker for Mucopolysaccharidosis II, IVA, and IVB. *JIMD Rep.* 21, 1–13.
- Singh, J., Di Ferrante, N., Niebes, P., and Tavella, D. (1976). N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase in Man ABSENCE OF THE ENZYME IN MORQUIO DISEASE.
- Smith, S.E., Potier, A., Trometer, J., Tsun Au, Y., DiPerna, J., Vranish, A., and Gelb, M. (2018). Simultaneous measurement of lysosomal enzyme activities associated with MPS II, MPS IIIB, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI, MPS VII, and CLN 2 disorders from a dried blood spot via LC-MS/MS. In *WorldSymposium*, pp. 64–65.
- Srivastava, C.H., Samulski, R.J., Lu, L., Larsen, S.H., and Srivastava, A. (1989). Construction of a recombinant human parvovirus B19: adeno-associated virus 2 (AAV) DNA inverted terminal repeats are functional in an AAV-B19 hybrid virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 8078–8082.
- Tan, G.-K., and Tabata, Y. (2014). Chondroitin-6-sulfate attenuates inflammatory responses in murine macrophages via suppression of NF- κ B nuclear translocation. *Acta Biomater.* 10, 2684–2692.
- Taylor, K.R. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 20, 9–22.
- Tessitore, A., Faella, A., O'Malley, T., Cotugno, G., Doria, M., Kunieda, T., Matarese, G., Haskins, M., and Auricchio, A. (2007). Biochemical, pathological, and skeletal improvement of mucopolysaccharidosis VI after gene transfer to liver but not to muscle. *Mol. Ther.* 16, 30–37.
- Testa, F., Maguire, A.M., Rossi, S., Pierce, E.A., Melillo, P., Marshall, K., Banfi, S., Surace, E.M., Sun, J., Acerra, C., et al. (2013). Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with leber congenital amaurosis type 2. *Ophthalmology* 120, 1283–1291.
- Theroux, M.C., Nerker, T., Ditro, C., and MacKenzie, W.G. (2012). Anesthetic care and perioperative complications of children with Morquio syndrome. *Paediatr. Anaesth.* 22, 901–907.
- Toietta, G., Severini, G.M., Traversari, C., Tomatsu, S., Sukegawa, K., Fukuda, S., Kondo, N., Tortora, P., and Bordignon, C. (2001). Various cells retrovirally transduced with N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase correct Morquio skin fibroblasts in vitro. *Hum. Gene Ther.* 12, 2007–2016.
- Tollersrud, G., and Berg, T. (2005). Lysosomal storage disorders. In *Lysosomes*, (Landes Bioscience), pp. 60–73.
- Tomatsu, S., Fukuda, S., Masue, M., Sukegawa, K., Fukao, T., Yamagishi, A., Hori, T., Iwata, H., Ogawa, T., Nakashima, Y., et al. (1991). Morquio disease: Isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 677–683.

- Tomatsu, S., Orii, K.O., Vogler, C., Nakayama, J., Levy, B., Grubb, J.H., Gutierrez, M.A., Shim, S., Yamaguchi, S., Nishioka, T., et al. (2003). Mouse model on N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency (Galns^{-/-}) produced by targeted disruption of the gene defective in Morquio A disease. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3349–3358.
- Tomatsu, S., Montaña, A.M., Nishioka, T., Gutierrez, M.A., Peña, O.M., Tranda firescu, G.G., Lopez, P., Yamaguchi, S., Noguchi, A., and Orii, T. (2005a). Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum. Mutat.* 26, 500–512.
- Tomatsu, S., Gutierrez, M., Nishioka, T., Yamada, M., Yamada, M., Tosaka, Y., Grubb, J.H., Montaña, A.M., Vieira, M.B., Trandafirescu, G.G., et al. (2005b). Development of MPS IVA mouse (Galnstm(hC79S-mC76S)slu) tolerant to human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3321–3335.
- Tomatsu, S., Vogler, C., Montaña, A.M., Gutierrez, M., Oikawa, H., Dung, V.C., Orii, T., Noguchi, A., and Sly, W.S. (2007a). Murine model (Galnstm(C76S)slu) of MPS IVA with missense mutation at the active site cysteine conserved among sulfatase proteins. *Mol. Genet. Metab.* 91, 251–258.
- Tomatsu, S., Montaña, A.M., Gutierrez, M., Grubb, J.H., Oikawa, H., Dung, V.C., Ohashi, A., Nishioka, T., Yamada, M., Yamada, M., et al. (2007b). Characterization and pharmacokinetic study of recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Mol. Genet. Metab.* 91, 69–78.
- Tomatsu, S., Montaña, A.M., Ohashi, A., Gutierrez, M.A., Oikawa, H., Oguma, T., Dung, V.C., Nishioka, T., Orii, T., and Sly, W.S. (2008). Enzyme replacement therapy in a murine model of Morquio A syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 17, 815–824.
- Tomatsu, S., Montaña, A.M., Oguma, T., Dung, V.C., Oikawa, H., De Carvalho, T.G., Gutiérrez, M.L., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Fukushi, M., et al. (2010a). Validation of keratan sulfate level in mucopolysaccharidosis type IVA by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 35–42.
- Tomatsu, S., Montaña, A.M., Dung, V.C., Ohashi, A., Oikawa, H., Oguma, T., Orii, T., Barrera, L., and Sly, W.S. (2010b). Enhancement of drug delivery: Enzyme-replacement therapy for murine morquio a syndrome. *Mol. Ther.* 18, 1094–1102.
- Tomatsu, S., Montaña, A., Alméjiga-Díaz, C., and Barrera, L. (2010c). Delivery of therapeutic agents to the bone.
- Tomatsu, S., Alméjiga-Díaz, C.J., Barbosa, H., Montaña, A.M., Barrera, L.A., Shimada, T., Yasuda, E., Mackenzie, W.G., Mason, R.W., Suzuki, Y., et al. (2014). Therapies of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A syndrome). *Expert Opin Orphan Drugs* 1846853, 805–818.
- Tomatsu, S., Montaña, A.M., Oikawa, H., Dung, V.C., Hashimoto, A., Oguma, T., Gutiérrez, M.L., Takahashi, T., Shimada, T., Orii, T., et al. (2015). Enzyme replacement therapy in newborn mucopolysaccharidosis IVA mice: Early treatment rescues bone lesions? *Mol. Genet. Metab.* 114, 195–202.
- Tomatsu, S., Averill, L.W., Sawamoto, K., Mackenzie, W.G., Bober, M.B., Pizarro, C., Goff, C.J., Xie, L., and Orii, T. (2016). Obstructive airway in Morquio A syndrome, the past, the present and the future. *Mol Genet Metab* 117, 150–156.

- Tomatsu, S., Sawamoto, K., Sakai, T., Kitazawa, I., Futatsumori, H., Nakamura, T., and I, N. (2018). Substrate degradation enzyme therapy (SDET) for mucopolysaccharidosis type IVA. *Mol. Genet. Metab.* 123, 140.
- Valstar, M.J., Neijs, S., Bruggenwirth, H.T., Olmer, R., Ruijter, G.J.G., Wevers, R.A., Van Diggelen, O.P., Poorthuis, B.J., Halley, D.J., and Wijburg, F.A. (2010). Mucopolysaccharidosis type IIIA: Clinical spectrum and genotype-phenotype correlations. *Ann. Neurol.* 68, 876–887.
- Varki, A., and Kornfeld, S. (1981). Purification and characterization of rat liver alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 256, 9937–9943.
- Vellodi, A. (2005). Lysosomal storage disorders. *Br. J. Haematol.* 128, 413–431.
- Venn, G., and Mason, R.M. (1985). Absence of keratan sulphate from skeletal tissues of mouse and rat. *Biochem. J.* 228, 443–450.
- Vitner, E.B., Platt, F.M., and Futerman, A.H. (2010). Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J. Biol. Chem.* 285, 20423–20427.
- W Rastall, D.P., and Amalfitano, A. (2017). Current and Future Treatments for Lysosomal Storage Disorders. *Curr Treat Options Neurol* 19.
- Waheed, A., Hasilik, A., and von Figura, K. (1981). Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes. Characterization and partial purification of a microsomal alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 256, 5717–5721.
- Wang, J., Luan, Z., Jiang, H., Fang, J., Qin, M., Lee, V., and Chen, J. (2016). Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Thirty-Four Pediatric Cases of Mucopolysaccharidosis—A Ten-Year Report from the China Children Transplant Group. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 22, 2104–2108.
- Wang, L., Bell, P., Somanathan, S., Wang, Q., He, Z., Yu, H., McMenemy, D., Goode, T., Calcedo, R., and Wilson, J.M. (2015). Comparative Study of Liver Gene Transfer with AAV Vectors Based on Natural and Engineered AAV Capsids. *Mol. Ther.* 23, 1877–1887.
- Ward, N.J., Buckley, S.M.K., Waddington, S.N., VandenDriessche, T., Chuah, M.K.L., Nathwani, A.C., McIntosh, J., Tuddenham, E.G.D., Kinnon, C., Thrasher, A.J., et al. (2011). Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression. *Blood* 117, 798–807.
- Weidemann, F., Niemann, M., Breunig, F., Herrmann, S., Beer, M., Störk, S., Voelker, W., Ertl, G., Wanner, C., and Strotmann, J. (2009). Long-Term Effects of Enzyme Replacement Therapy on Fabry Cardiomyopathy: Evidence for a Better Outcome With Early Treatment. *Circulation* 105, 539–542.
- Wenger, D.A., Coppola, S., and Liu, S.-L. (2002). Lysosomal storage disorders: diagnostic dilemmas and prospects for therapy. *Genet. Med.* 4, 412–419.
- de Wet, J.R., Wood, K. V, de Luca, M., Helinski, D.R., and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 7, 725–737.
- Whitley, C.B., Ridnour, M.D., Draper, K.A., Dutton, C.M., and Neglia, J.P. (1989). Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. I. Direct method for quantifying excessive urinary glycosaminoglycan excretion. *Clin. Chem.* 35, 374–379.

- Wilcox, W.R. (2004). Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J. Pediatr.* 144, S3–S14.
- Winchester, B., Vellodi, A., and Young, E. (2000). The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochem. Soc. Trans.* 28.
- Wolfe, B.J., Blanchard, S., Sadilek, M., Scott, C.R., Turecek, F., and Gelb, M.H. (2011). Tandem mass spectrometry for the direct assay of lysosomal enzymes in dried blood spots: Application to screening newborns for mucopolysaccharidosis II (Hunter Syndrome). *Anal. Chem.* 83, 1152–1156.
- Wu, Z., Yang, H., and Colosi, P. (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther.* 18, 80–86.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., and Chapman, M.S. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10405–10410.
- Xu, H., and Ren, D. (2015). Lysosomal physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 77, 57–80.
- Yabe, H., Tanaka, A., Chinen, Y., Kato, S., Sawamoto, K., Yasuda, E., Shintaku, H., Suzuki, Y., Orii, T., and Tomatsu, S. (2016). Hematopoietic stem cell transplantation for Morquio A syndrome. *Mol. Genet. Metab.* 117, 84–94.
- Yasuda, E., Fushimi, K., Suzuki, Y., Shimizu, K., Takami, T., Zustin, J., Patel, P., Ruhnke, K., Shimada, T., Boyce, B., et al. (2013). Pathogenesis of morquio A syndrome: An autopsied case reveals systemic storage disorder. *Mol. Genet. Metab.* 109, 301–311.
- Zanta-Boussif, M.A., Charrier, S., Brice-Ouzet, A., Martin, S., Opolon, P., Thrasher, A.J., Hope, T.J., and Galy, A. (2009). Validation of a mutated PRE sequence allowing high and sustained transgene expression while abrogating WHV-X protein synthesis: Application to the gene therapy of WAS. *Gene Ther.* 16, 605–619.
- Zhang, H., Uchimura, K., and Kadomatsu, K. (2006). Brain keratan sulfate and glial scar formation. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 81–90.
- Zhao, H., Van Diggelen, O.P., Thoomes, R., Huumans, J., Young, E., Mazurczak, T., and Kleijer, W.J. (1990). Prenatal diagnosis of morquio disease type a using a simple fluorometric enzyme assay. *Prenat. Diagn.* 10, 85–91.
- Ziaei, M., Zhang, J., Patel, D. V., and McGhee, C.N.J. (2017). Umbilical cord stem cells in the treatment of corneal disease. *Surv. Ophthalmol.* 62, 803–815.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* 16, 1073–1080.

