



Universitat Autònoma de Barcelona

**TERAPIA GÉNICA IN VIVO PARA LA MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA:
ESTUDIO DE LA EFICACIA EN UNA NUEVA RATA MODELO DE LA ENFERMEDAD**

JOAN BERTOLÍN GÁLVEZ

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

**TERAPIA GÉNICA *IN VIVO* PARA LA
MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA:
ESTUDIO DE LA EFICACIA EN UNA NUEVA RATA
MODELO DE LA ENFERMEDAD**

JOAN BERTOLÍN GÁLVEZ

FÁTIMA BOSCH TUBERT

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

JOAN BERTOLÍN GÁLVEZ

FÁTIMA BOSCH TUBERT

SEPTIEMBRE 2019

BELLATERRA

*No digo que vaya a ser fácil,
pero valdrá la pena*

Tras meses de travesía el día soñado ha llegado. Desde la cima, miro atrás y me siento feliz. Podría parecer un mero trámite, pero realizar un doctorado significa mucho más. Aprendizaje, ese sería el término. Aprender ciencia, a caerse y a levantarse, a trabajar con perseverancia, aprender de mis defectos, de mis virtudes, al fin y al cabo, aprender a superarse y ser mejor. Y pese a terribles caídas hoy doy las gracias por todo lo aprendido e intensamente vivido. Evidentemente, esto no sería posible sin todos esos compañeros de viaje que nos dan la mano cuando uno no consigue ver la luz al final del camino.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi directora de tesis, la **Dra. Fàtima Bosch**, cuyo esfuerzo y dedicación no sólo han permitido crear un competente centro de investigación, sino que también me han aportado la energía y profesionalidad para hacer de mi un mejor científico.

En segundo lugar, ¡Gracias al resto del equipo! Gracias al grupo de *LSD* por acogirme profesional y personalmente. A **Albert**, por guiarme durante todo el proyecto de Morquio. A **Sara** por tu ayuda, pero sobre todo por las clases de catalán *per chaves*. A **Jenni** por tu sentido del humor y esa alegría canaria que alegra a cualquiera. A **Gemma**, que pese ser la última incorporación me hace feliz llamarla amiga. A **Carles**, evidentemente por nuestros momentos “vídeos absurdos” y, claro, por ser una gran persona. A **Víctor**, que me abrió las puertas del CBATEG y me apoyó en los momentos más difíciles, ¡Viviendo juntos grandes aventuras! A **Xavi**, con el que empecé este camino siendo un par de desconocidos y acabó ganándose un amigo para toda la vida. ¡Gracias por todo lo vivido dentro y fuera del laboratorio, eres especial! A los que una vez formaron parte del centro, **Luca, Cristina, Javi, Sandra y Vicky**, por vuestra guía y sonrisas compartidas ¡Espero veros pronto! Gracias infinitas también a mi fiel *Rateam*, sin los cuales este proyecto no habría sido posible. **Marisa, Ángel, Lorena, Sergio y Miquel** gracias por vuestra gran predisposición en el trabajo, y especialmente por el buen ambiente que aportáis tras tantas horas de animalario. ¡Al *Adipose Team* por nuestras aventuras extraescolares! A **Claudia** por ser la campeona de combate especialista en encontrar un doble sentido o una relación con los *Simpsons*. A la dulce **Estefanía**, por sus abrazos llenos de significado. A **Víctor** por ese café que ha permitido escribir esta tesis. A **Jordi** y a **Ignasi** por sus charlas plenarias sobre *Castells*, con las que podría escribir al menos tres enciclopedias. Gracias a mis queridos compañeros de despacho de la 3ª planta. A **Vero**, por nuestras aventuras en “las bodas rojas”. A **María** por ser tan entrañable y única. A **Xavi León** por nuestras interesantes charlas humorísticas y por las clases de *jiu-jitsu*. Gracias a las chicas de la 4ª **Ivet, Laia, Tura, Sylvie, Meritxell** y, en especial, a **Alba** por estar ahí cuando más lo necesité. Gracias

al **Dr. Ruberte**, director del equipo de análisis morfológico por su profesionalidad, guía e implicación en este proyecto. A **Vero** y **Marc**, por todos los análisis morfológicos. Gracias a la UAT. A **Anna P**, **Anna A** y **Sandra**, sin las cuales no hubiera sido posible la generación del modelo animal de esta tesis. Muchas gracias también a **Jenny**, **Lidia**, **Marta**, **Montse** y **Rosmi** que técnica o administrativamente han sido fundamentales durante el proyecto. A **Pedro** y al **personal del Servei d'Estabulari de la UAB**, por vuestro profesional trabajo en el control y mantenimiento de los animales. Gracias a la **Dra. Ribas** y todo su equipo del Hospital Clínic de Barcelona, especialmente a **Laia** y **Judit**. Finalmente, querría dar las gracias también a todo el personal de **mantenimiento, limpieza y seguridad** por vuestro importante trabajo en el centro.

En tercer lugar, querría dar las gracias a aquellos que me han acompañado desde fuera del proyecto y tienen un lugar eterno en mí. Gracias a mis incondicionales amigos sin los cuales los momentos de estrés hubieran sido insufribles: **Albert** y **Giner**, a los cangrejos del río, **Fran**, **Godman**, **Edgar**, **Monti** y **Albert**, y a mis segundas esposas **Mireia** y **Andrea**. A mis **padres**, **Toni** y **Olga**, a mis abuelos, **Juan**, **Conchita**, **Toño** y **Encarnita**, a mi hermano **Dani** y a mi tío **Manolo**, por creer siempre en mí y hacerme la persona que soy hoy en día. Me habéis aportado fuerza, bondad y felicidad, gracias de todo corazón por todo lo que habéis dado por mí estos años. Sé que nuestra familia es pequeña y que, aunque algunos ya no estéis, me seguís aportando el amor de cien personas. A mi nueva **familia Prada-Dacasa**, especialmente a **Manolo**, **Victoria**, **Manel**, **Bea** y a la pequeña **Paula** por recibirme con los brazos siempre abiertos. A mis vecinos **Montero**, que, aunque no sean de sangre, ¡Siempre han estado ahí! Especialmente, quería dar las gracias a **Pati**, la luz que me ha iluminado cuando la oscuridad se cernía sobre mí. Has sido ese brazo que me ha levantado siempre que he caído derrotado, mi mayor pilar desde que te conocí. Me has dado fuerza y valor, la esperanza y perseverancia que he necesitado para seguir adelante en los momentos más duros de esta etapa, haciéndome cada día mejor. Hemos caminado juntos este camino, sufriendolo y disfrutándolo, pero lo más importante es que lo hemos vivido juntos. Ahí estaré siempre para ti, porque tú también lo has estado para mí. Te quiero y espero algún día estar a la altura de lo increíble que eres.

Finalmente, esta tesis ha sido posible, gracias al financiamiento recibido del Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional I+D+I (SAF2017-86266-R); de la Comisión Europea (MYOCURE, PHC-14-2015, Project nº667751); 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.

°C	Grado Centígrado
β-Gal	β-Galactosidasa
μCT	Microtomografía Computarizada
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
3MSCT	<i>3 Minutes Stair Climb Test</i> ; Test de Subir Escaleras en 3 Minutos
4-MU	4-Metilumbeliferona
6MWT	<i>6 Minutes Walking Test</i> ; Test de la marcha de 6 minutos
aa	Aminoácido
AAP	Proteína activadora de ensamblaje
AAV	<i>Adeno-associated virus</i> ; Virus adenoasociado
ADP	Adenosín difosfato
AG	Aparato de Golgi
Amp^R	Resistencia a Ampicilina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
BC	<i>British Columbia</i>
BHE	Barrera Hematoencefálica
BMC	<i>Bone Mineral Content</i> ; Contenido mineral óseo
BMD	<i>Bone Mineral Density</i> ; Densidad mineral ósea
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i> ; Proteínas Morfogénicas Óseas
BPM	<i>Beats Per Minute</i> ; Latidos por minuto
BS/BV	<i>Bone Surface/Bone Volume</i> ; Superficie ósea/volumen óseo
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BV/TV	<i>Bone Volume/Tissue Volume</i> ; Volumen óseo/volumen de tejido
C4S	Condroitín-4-Sulfato
C6S	Condroitín-6-Sulfato
Ca²⁺	Ión de calcio
CAG	Promotor híbrido formado por el <i>enhancer</i> del CMV y por el promotor de la β-actina de pollo
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i> ; Proteína asociada CRISPR 9
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 <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> ;
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
CS	Condroitín Sulfato
CsCl	Cloruro de Cesio
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Cys	Cisteína
D8	Octapéptido de ácido aspártico
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
dsDNA	<i>Double-Stranded DNA</i> ; DNA de cadena doble
E6	Hexaglutamato
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EEUU	Estados Unidos
EF1	Factor de elongación 1 α
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ; Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EMA	<i>European Medicines Agency</i> ; Agencia Europea del Medicamento
eWAT	<i>epididymal White Adipose Tissue</i> ; Tejido adiposo blanco epididimal
ERT	<i>Enzyme Replacement Therapy</i> ; Terapia de Reemplazo Enzimático
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ; Administración de Medicamentos y Alimentos
FGFR1	Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos tipo 1
g	gramos
G/C	Guanina/Citosina
GAG	Glicosaminoglicano
GALNS	<i>N-acetylgalactosamine 6-sulfatase</i> ; N-acetilgalactosamina 6- sulfatasa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> ; Proteína Verde Fluorescente
GST	<i>Grip Strength Test</i> ; Test de fuerza de agarre

gRNA	RNA guía
h	Hora
H⁺	Hidrón
HA	Hidroxiapatita
hAAT	α -antitripsina humana
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HDR	<i>Homology directed repair</i> ; reparación dirigida por homología
HE	Hematoxilina-eosina
Het	Heterocigoto
HGFR	Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos
Homo	Homocigoto
HSCT	<i>Hematopoietic Stem Cells Transplantation</i> ; Trasplante de Células Madre Hematopoyéticas
hUMSC	<i>Human Umbilical cord-derived Mesenchymal Stem Cell</i> ; Células Madre Mesenquimales Humanas de Cordón Umbilical
ICORD	<i>International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs</i>
ITR	<i>Inverted Terminal Repeat</i> ; Repetición Terminal Invertida
IV	Intravenosa
kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
KS	<i>Keratan Sulphate</i> ; Queratán Sulfato
KI	<i>Knock-in</i>
KO	<i>Knock-out</i>
KOL	<i>Key Opinion Leader</i>
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i> ; Proteína lisosomal asociada a membrana tipo 1
LAMP2	<i>Lysosomal-associated membrane protein 2</i> ; Proteína lisosomal asociada a membrana tipo 2
LamR	Receptor de Laminina
LC-MS/MS	Espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida
LIMP2	<i>Lysosomal integral membrane protein 2</i> ; Proteína integral de la membrana lisosomal 2
LSD	<i>Lysosomal Storage Diseases</i> ; Enfermedades de depósito lisosomal
m	metro
M6P	Manosa-6-Fosfato

M6PR	Receptor de Manosa-6-Fosfato
MEC	Matriz Extracelular
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MPS	Mucopolisacaridosis
mRNA	RNA mensajero
miRNA	micro RNA
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
m/z	Masa/carga
N	Newton
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	No detectable
ng	Nanogramo
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NHEJ	<i>Non homologous end joining</i> ; uniones de extremos no homólogos
nm	nanometro
OA	Osteoartritis
o/n	<i>Overnight</i>
orGalns	<i>Galns</i> de rata optimizada
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>Open Reading Frame</i> ; Marco Abierto de Lectura
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i> ; Motivo Adyacente de Protoespaciador
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
PDGFR	Receptor del Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehido
PML	Proteínas de membrana lisosómica
PMSG	Gonadotropina sérica
POR	<i>Patient organisation representative</i>
qPCR	PCR Cuantitativa

rAAV	Vector adenoasociado recombinante
RB	<i>Roller Bottle</i>
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
rGALNS	GALNS recombinante
RNA	Ácido Ribonucléico
RPKM	<i>Reads per kilobase per million reads placed</i>
Rpm	Revolución por minuto
s	Segundo
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> ; Error estándar de la media
SE	Servicio de Estabulación de la UAB
Ser	Serina
SMA1	<i>Spinal muscular atrophy 1</i> ; Atrofia Muscular Espinal 1
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ; Polimorfismo de Nucleótido Único
ssDNA	<i>Single-Stranded DNA</i> ; DNA de cadena sencilla
SUMF1	<i>Sulfatase Modifying Factor 1</i>
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i> ; nucleasa de actividad similar a activador de transcripción
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Espaciamiento trabecular
Tb.Th	Espesor trabecular
TMC	<i>Tissue Mass Content</i> ; Contenido de masa de tejido
TMD	<i>Tissue Mass Density</i> ; Densidad de masa de tejido
U	Unidades
UI	Unidades Internacionales
UAB	Universidad Autónoma de Barcelona
UE	Unión Europea
UTR	<i>Untranslated Region</i> ; Regiones no traducidas
V	Voltio
VP	<i>Viral Protein</i> ; Proteína Viral
vg	<i>Viral Genome</i> ; Genoma Viral
w/v	<i>Weight/Volume</i> ; Peso/Volumen
WT	<i>Wild-type</i> ; Tipo salvaje
ZFN	<i>Zinc-finger nucleases</i> ; Nucleasas con dedos de zinc

I. PRESENTACIÓN	1
II. INTRODUCCIÓN	5
1. ENFERMEDADES POR DEPÓSITO LISOSOMAL	7
1.1. Lisosomas y enzimas lisosomales.....	7
1.2. Enfermedades por depósito lisosomal.....	8
2. MUCOPOLISACARIDOSIS	10
2.1. Glicosaminoglicanos	13
3. MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA	15
3.1. Prevalencia de la MPS IVA	16
3.2. Enzima N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS).....	16
3.2.1. Gen codificante para la proteína GALNS humana.....	16
3.2.2. Enzima GALNS.....	17
3.2.3. Mutaciones en el gen <i>GALNS</i> humano	20
3.3. Correlación genotipo-fenotipo	22
3.4. Acción biológica del Queratán Sulfato.....	23
3.5. Acción biológica del Condroitín-6-Sulfato.....	24
3.6. Fisiopatología de la MPS IVA.....	25
3.7. Sintomatología de la MPS IVA	27
3.7.1. Síntomas iniciales	27
3.7.2. Alteraciones esqueléticas.....	28
3.7.3. Alteraciones articulares.....	28
3.7.4. Alteraciones dentales.....	29
3.7.5. Alteraciones orgánicas.....	30
3.7.5.1. Alteraciones respiratorias.....	30
3.7.5.2. Alteraciones cardíacas.....	31
3.7.5.3. Alteraciones de la córnea.....	31
3.7.5.4. Alteraciones de la capacidad auditiva	32

5.2. Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 en la edición genética dirigida	50
III. OBJETIVOS	53
IV. RESULTADOS	57

Parte 1. Generación y caracterización de una rata modelo de la MPS IVA

1. GENERACIÓN DE UNA RATA <i>KNOCK-IN</i> MODELO DE LA MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA (MPS IVA)	61
1.1. Estrategia de generación de una nueva rata modelo de la MPS IVA mediante edición genética con la tecnología de CRISPR/Cas9	61
1.2. Secuenciación de alelos del gen <i>Galns</i>	64
1.3. Obtención de la rata modelo de MPS IVA tras retrocruces selectivos para la segregación cromosómica de <i>off-targets</i>	67
2. CARACTERIZACIÓN DE LA RATA MODELO DE MPS IVA	69
2.1. Análisis de actividad GALNS y la acumulación de KS en las ratas MPS IVA	69
2.2. Análisis de la patología ósea en ratas MPS IVA.....	70
2.3. Detección de osteoartritis en las articulaciones de las ratas MPS IVA	74
2.4. Evaluación de la patología dental de las ratas MPS IVA	77
2.5. Anomalías en las vías respiratorias de las ratas MPS IVA	78
2.6. Análisis de las alteraciones cardíacas de las ratas MPS IVA	82
2.7. Detección de material de almacenamiento en cerebro de ratas MPS IVA	83

Parte 2. Estudio de la biodistribución de vectores AAV9-GFP en el sistema esquelético tras una administración intravenosa

1. ESTUDIO DE LA BIODISTRIBUCIÓN DEL VECTOR ADENOASOCIADO DE SEROTIPO 9 (AAV9) PARA LA TRANSFERENCIA GÉNICA EN LA MPS IVA ..	89
1.1. Administración intravenosa del vector AAV9-GFP en ratas.....	89
1.2. Biodistribución del vector AAV9-GFP en el tejido óseo	90

1.3. Biodistribución del vector AAV9-GFP en órganos periféricos y encéfalo de ratas	93
1.4. Biodistribución del vector AAV9-GFP en los dientes de la rata.....	94

Parte 3. Tratamiento de la rata modelo de la MPS IVA con el vector AAV9-

Galns

1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR VIRAL ADENOASOCIADO DE SEROTIPO 9 CODIFICANTE PARA LA PROTEÍNA GALNS DE RATA.....	99
2. APROXIMACIÓN DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE MORQUIO A BASADA EN LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE AAV9-GALNS EN RATAS MACHO MPS IVA	100
2.1. Efecto del tratamiento con AAV9-Galns sobre el tamaño corporal y la supervivencia de las ratas MPS IVA.....	101
2.2. Incremento de la actividad GALNS circulante y corrección del contenido de KS en suero tras el tratamiento con AAV9-Galns.....	104
2.3. Efecto del tratamiento con AAV9-Galns en hígado y tejido adiposo de ratas MPS IVA	105
2.4. Efecto de la administración intravenosa de AAV9-Galns sobre la patología ósea de las ratas MPS IVA	109
2.5. Efecto de la administración intravenosa de vector AAV9-Galns sobre las articulaciones de las ratas MPS IVA.....	117
2.6. Efecto de la administración intravenosa de AAV9-Galns en la patología dental de las ratas MPS IVA	121
2.7. Efecto de la administración intravenosa de AAV9-Galns sobre el sistema respiratorio.....	123
2.8. Efecto de la administración intravenosa de AAV9-Galns en la patología cardiovascular de las ratas MPS IVA	127

2.9. Efecto de la administración intravenosa de AAV9- <i>Galns</i> en el encéfalo de las ratas MPS IVA	130
3. ESTUDIO DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE AAV9-GALNS EN RATAS HEMBRA MPS IVA.....	132
V. DISCUSIÓN	135
VI. CONCLUSIONES	151
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	155
1. MATERIALES	157
1.1. Animales	157
1.2. Cepas bacterianas	158
1.3. Anticuerpos	158
1.4. Plásmidos	159
1.5. Reactivos	160
2. MÉTODOS.....	161
2.1. Microinyección en embriones de rata de una célula	161
2.2. Técnicas de manipulación del DNA.....	161
2.2.1. Preparación del DNA plasmídico.....	161
2.2.2. Digestión del DNA con enzimas de restricción	162
2.2.3. Desfosforilación del fragmento de DNA.....	162
2.2.4. Generación de extremos romos en fragmentos de DNA	163
2.2.5. Ligación de fragmentos de DNA.....	163
2.2.6. Transformación en células competentes <i>E. coli</i> XL2Blue	163
2.2.7. Purificación y resolución del DNA.....	164
2.3. Técnicas de obtención y manipulación del RNA.....	164
2.3.1. Aislamiento y purificación de RNA total.....	164
2.3.2. Síntesis de cDNA	165

2.3.3. Cuantificación de la expresión de mRNA por PCR cuantitativa	165
2.4. Construcción de plásmidos	166
2.4.1. Optimización de las secuencias de DNA	167
2.4.2. Construcción del plásmido pAAV-CAG-or <i>Galns</i>	167
2.5. Producción, purificación y titulación de vectores virales adenoasociados ...	167
2.5.1. Producción y purificación	167
2.5.2. Titulación de genomas virales	169
2.5.3. Cuantificación de las partículas virales por tinción de plata.....	171
2.6. Genotipado de las ratas	172
2.6.1. Purificación de DNA genómico.....	173
2.6.2. Genotipado por PCR.....	173
2.6.3. Genotipado por secuenciación de Sanger.....	174
2.6.4. Secuenciación de alelos <i>Galns</i> por separado.....	175
2.7. Administración intravenosa de vectores AAV	176
2.8. Obtención de muestras de suero de ratas.....	177
2.9. Eutanasia y obtención de muestras biológicas <i>post mortem</i> de ratas.....	177
2.10. Protocolo de descalcificación de huesos de rata.....	177
2.11. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford.....	178
2.12. Determinación de actividad GALNS.....	178
2.13. Determinación de actividad β -Hexosaminidasa.....	179
2.14. Determinación del contenido de GAGs	179
2.15. Inmunohistoquímica de secciones tisulares en bloques de parafina	180
2.16. Tinción hematoxilina-eosina y <i>Safranin Orange</i>	181
2.17. Cuantificación del área de la placa de crecimiento en campo claro	181
2.18. Microscopia electrónica de transmisión.....	182
2.19. Tinción con azul de toluidina en secciones semifinas	182
2.20. Análisis de la fluorescencia específica de GFP.....	182
2.21. Análisis óseo por microtomografía computarizada (μ CT) de rayos X.....	183

2.22. Test de fuerza de agarre (GST)	183
2.23. Análisis de la frecuencia cardíaca.....	183
2.24. Medición de la longitud naso-anal.....	184
2.25. Análisis estadístico	184
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	185

I. Presentación

La Mucopolisacaridosis tipo IVA (MPS IVA) o Síndrome de Morquio A es una enfermedad de depósito lisosomal causada por la deficiencia de la enzima N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS). La ausencia de esta enzima conduce a la acumulación patológica de los glicosaminoglicanos (GAG) Queratán Sulfato (KS) y Condroitín-6-Sulfato (C6S), principalmente en los condrocitos y en la matriz extracelular del cartílago. Esto tiene un impacto directo en el desarrollo del cartílago y el hueso, lo que genera una displasia esquelética sistémica y un deterioro temprano del cartílago.

El desarrollo de estrategias terapéuticas depende, en gran medida, de la generación de modelos animales que desarrollen las alteraciones patológicas de la enfermedad humana. Actualmente, no existe un modelo animal que desarrolle todos los signos clínicos de la MPS IVA, dado que los ratones modelo descritos no presentan la patología esquelética característica de los pacientes. A diferencia de los ratones, para diferentes enfermedades, las ratas modelo han desarrollado fenotipos más similares a los observados en pacientes humanos. Dada la necesidad de un modelo animal que mimetice las alteraciones patológicas de los pacientes de Morquio A, el primer objetivo de la presente tesis doctoral fue generar una rata modelo de la MPS IVA.

Por ello, se generó la rata MPS IVA introduciendo la mutación humana *missense* más frecuente en pacientes (c.1156C>T) mediante la tecnología CRISPR/Cas9 y, posteriormente, se caracterizó este nuevo modelo. Este estudio evidenció que la rata MPS IVA era capaz de desarrollar los signos clínicos de la enfermedad de Morquio A, como son las alteraciones en el tamaño corporal, pérdida temprana del cartílago articular, hipertrofia de condrocitos, hipoplasia del esmalte y acumulación de GAGs en distintos órganos y tejidos. Además, se observó que, como consecuencia de la falta de actividad GALNS, las ratas MPS IVA presentaron una esperanza de vida considerablemente más corta en comparación con ratas sanas.

Actualmente, no existe un tratamiento eficaz para la MPS IVA. La falta de eficacia terapéutica de la terapia de reemplazo enzimático (ERT) en la corrección de la patología esquelética y el elevado coste económico de las administraciones semanales, hace necesario el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas. La terapia génica *in vivo*, basada en la administración de vectores adenoasociados (AAV), representa una de las alternativas más prometedoras, ya que ha demostrado ser eficaz a largo plazo en el tratamiento de un gran número de enfermedades de origen genético.

Por ello, en primer lugar, se estudió la capacidad de transducción del vector AAV9 del tejido óseo y del resto de los órganos afectados en pacientes de Morquio A. Los resultados obtenidos en el estudio de biodistribución del vector AAV9-GFP

demonstraron una alta eficiencia de transducción de los huesos, dientes, órganos periféricos y sistema nervioso central (SNC).

En la presente tesis doctoral se ha desarrollado una estrategia de terapia génica basada en la administración intravenosa de un vector AAV9 codificante para la proteína GALNS de rata (AAV9-*Galns*), con el objetivo de corregir las alteraciones fenotípicas observadas en la rata MPS IVA. Una única administración sistémica del vector terapéutico AAV9-*Galns* en ratas MPS IVA permitió el incremento de la actividad GALNS en suero y en todos los órganos y tejidos analizados, como hígado, tejido adiposo, fémur, tráquea, pulmón, corazón y encéfalo. Además, este tratamiento permitió una recuperación del peso corporal y de la longitud naso-anal, mejorando también la tasa de supervivencia. El tratamiento con AAV9-*Galns* llevó a una mejora de la patología del cartílago de crecimiento de las ratas MPS IVA no tratadas y a una normalización de los niveles de KS. Esto se tradujo, a nivel esquelético, en una normalización de la composición y estructura del hueso. Además, las ratas MPS IVA tratadas con el vector AAV9-*Galns* mostraron una mejoría de las alteraciones patológicas detectadas en las articulaciones, una reducción de los niveles de KS y una normalización de la fuerza de agarre. El tratamiento también fue capaz de recuperar el esmalte y mejorar las alteraciones dentarias de las ratas MPS IVA. A nivel periférico, se normalizaron los niveles de KS, reduciendo el número de células vacuoladas en el hígado, el sistema respiratorio y el cardiovascular. En cuanto al SNC, también se observó una normalización de los niveles de KS y de las alteraciones observadas en ratas MPS IVA no tratadas.

En conjunto, estos resultados mostraron que el nuevo modelo de rata MPS IVA era capaz de desarrollar los principales signos clínicos de los pacientes de Morquio A. Gracias a ello se pudo comprobar la eficacia terapéutica de la administración intravenosa del vector AAV9-*Galns* sobre el tejido óseo, los órganos periféricos y el SNC. La estrategia de terapia génica descrita en esta tesis doctoral puede constituir la base preclínica para la translación hacia la clínica de la transferencia génica de GALNS mediada por vectores AAV9 a pacientes de Morquio A.

II. Introducción

1. ENFERMEDADES POR DEPÓSITO LISOSOMAL

1.1. Lisosomas y enzimas lisosomales

Los lisosomas son orgánulos celulares rodeados por una bicapa lipídica que se encuentran en las células animales, descritos por primera vez en 1955 por Christian de Duve (Duve 2005). Estos orgánulos contienen enzimas hidrolíticas que degradan muchos tipos de biomoléculas y presentan un lumen ácido (pH 4,5-5,0) necesario para la activación de dichas enzimas. Además de la degradación de polímeros, el lisosoma está involucrado en otros procesos celulares, como la secreción, la reparación de la membrana plasmática, la señalización y el metabolismo energético.

Los lisosomas son capaces de degradar macromoléculas tanto del citoplasma como del medio extracelular. El material extracelular es incorporado a la célula mediante endocitosis, mientras que el material intracelular se digiere mediante autofagia. Además, estos orgánulos son capaces de liberar productos al medio extracelular, fusionando su bicapa lipídica con la membrana plasmática de la célula, en un proceso conocido como exocitosis (Settembre et al. 2013).

Los lisosomas contienen más de 60 hidrolasas ácidas diferentes (Xu and Ren 2015) y tienen más de 25 proteínas de membrana lisosómica (PML) (Saftig and Klumperman 2009). Entre todas las hidrolasas lisosomales, hay sulfatasas, glucosidasas, peptidasas, fosfatasas, lipasas y nucleasas, que permiten que el lisosoma degrade un amplio repertorio de sustratos biológicos en un pH ácido (Settembre et al. 2013). Dado que el pH citoplasmático es ~7,2, la célula está protegida de una digestión no controlada causada por una posible ruptura lisosomal. Por otra parte, las PML están implicadas en la acidificación de la luz lisosomal, la autofagia, la exocitosis y el transporte a través de la membrana lisosomal. Las PML más abundantes son la proteína integral de la membrana lisosomal 2 (LIMP2: *Lysosomal integral membrane protein-2*) y la proteína de membrana lisosomal asociada tipo 1 (LAMP1: *Lysosome-associated membrane protein 1*) y tipo 2 (LAMP2: *Lysosome-associated membrane protein 2*) (Saftig and Klumperman 2009).

Las enzimas lisosomales se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso como una forma inactiva y son transportadas al retículo endoplásmico liso gracias al péptido señal. Allí, se produce la pérdida del péptido señal y se producen glicosilaciones en el extremo N-terminal. Las hidrolasas lisosomales salen del retículo endoplásmico y alcanzan el aparato de Golgi (AG), donde se les añadirá el residuo de manosa-6-fosfato (M6P) gracias a la acción de las fosfotransferasas y diesterasas. La presencia de esta M6P permite la unión de las enzimas lisosomales a los receptores de manosa-6-fosfato

(M6PR) en el AG, lo que es crucial para el empaquetamiento adecuado en vesículas acidificadas (Figura 1).

Al abandonar el AG, la vesícula que contiene la enzima lisosomal se fusiona con un endosoma tardío, un orgánulo ácido. Este lumen ácido (pH de 5,5) permite la disociación de las enzimas lisosomales de los M6PR (Figura 1). Por otro lado, los M6PR pueden reutilizarse nuevamente en el AG o en la membrana plasmática (Hille-rehfeld 1995). Finalmente, los endosomas se fusionan con los lisosomas, lo que permite la maduración final de las enzimas lisosomales mediante proteólisis, plegamiento y agregación para adquirir su forma completamente activa. Sin embargo, las células también pueden captar enzimas lisosomales exógenas por endocitosis mediada por los M6PR de la membrana plasmática (Desnick and Schuchman 2002; Saftig and Klumperman 2009).

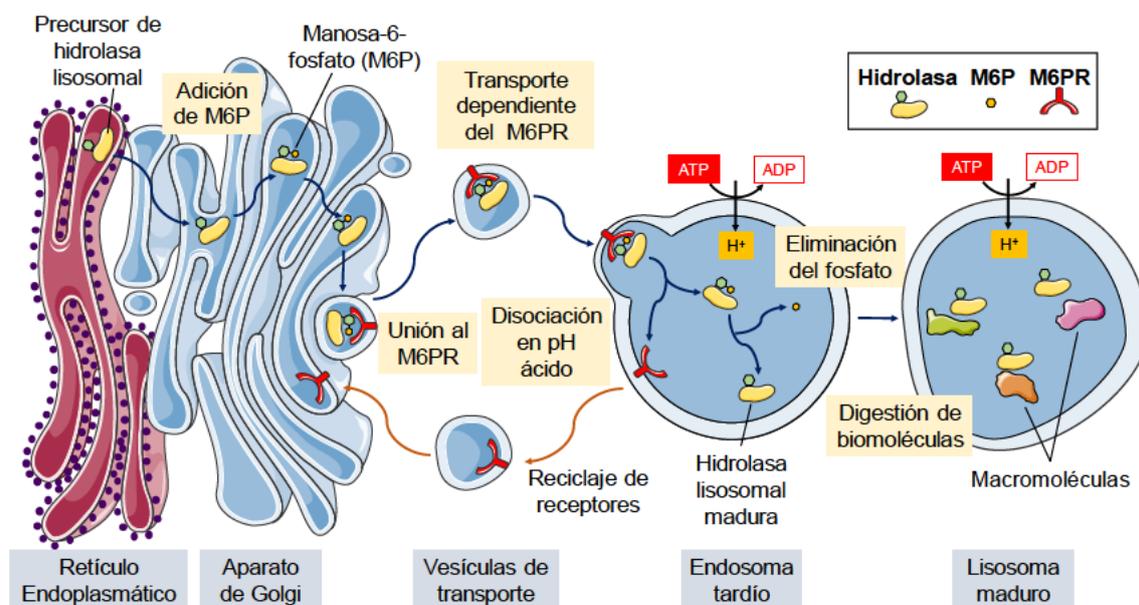


Figura 1. Hidrolasas ácidas y lisosomas. Los precursores de las hidrolasas lisosomales van del retículo endoplasmático al aparato de Golgi, donde se les añade la M6P característica de las enzimas lisosomales. La adición de la M6P permite la unión con el receptor M6PR y el transporte en vesículas hasta la fusión con un endosoma tardío. Allí, el pH ácido facilita la disociación de la enzima lisosomal del receptor M6PR y la maduración final de las hidrolasas. Mientras los M6PR se pueden reciclar (flechas naranjas), el endosoma tardío madura, dando lugar a los lisosomas que se encargaran de la degradación macromolecular.

1.2. Enfermedades por depósito lisosomal

Las enfermedades de depósito lisosomal, o almacenamiento lisosomal (LSD: *Lysosomal Storage Diseases*), son trastornos metabólicos minoritarios que están

caracterizados por una acumulación anómala de materiales dentro del lisosoma como resultado de la deficiencia de proteínas lisosomales.

Las LSD son enfermedades raras y en conjunto afectan a 1 de cada 5.000-7.000 nacimientos. Las enfermedades raras o minoritarias son aquellas que tienen una baja incidencia en la población, afectando a un número limitado de personas. En el caso de Europa, es necesaria una frecuencia de 1:2.000 habitantes para que la enfermedad sea considerada como rara, mientras que en Estados Unidos (EEUU) la frecuencia requerida es de 1:1.500 y en Japón, de 1:2.500 (International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs (ICORD) 2012). A nivel individual, cada enfermedad rara tiene una incidencia baja, pero a nivel global existen cerca de 7.000 enfermedades raras que afectan entre el 6 y el 8% de la población mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo, en cuanto a las LSD, no existe un consenso claro para definir la incidencia exacta de cada una de ellas, ya que ésta depende del área geográfica estudiada y de la eficiencia en su diagnóstico.

Hay cerca de 70 tipos distintos de enfermedades de acúmulo lisosomal, las cuales afectan a distintos órganos, incluyendo el esqueleto, los órganos periféricos y el sistema nervioso central (Platt et al. 2018). Estas alteraciones están causadas por mutaciones en genes que codifican enzimas lisosomales, cofactores o proteínas de transporte lisosomal. La deficiencia de una proteína lisosomal conlleva una acumulación de substratos parcialmente degradados dentro del lisosoma, provocando distensión lisosomal y daño celular. La acumulación progresiva de depósitos genera una disfunción celular y fallos sistémicos que se traducen, en la mayoría de los casos, en una reducción de la esperanza de vida de los pacientes (Muenzer 2011; Platt et al. 2018).

Existen varios tipos de LSD dependiendo del material acumulado, por ejemplo, los defectos en la degradación de glucolípidos que dan lugar a distintas formas de Gangliosidosis, o los defectos en enzimas lisosomales involucradas en el proceso de degradación de mucopolisacáridos, que dan lugar a las Mucopolisacaridosis.

2. MUCOPOLISACARIDOSIS

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de siete enfermedades de depósito lisosomal caracterizadas por la ausencia o deficiencia de una enzima lisosomal específica involucrada en el metabolismo de los glicosaminoglicanos (GAG) (Tabla 1). Al igual que en el resto de LSD, la deficiencia de la proteína lisosomal conlleva una acumulación de GAGs parcialmente degradados dentro del lisosoma que acaba generando disfunción y muerte celular. Esto afecta a múltiples tejidos y puede desarrollar neurodegeneración si hay afectación neuronal, fallo multisistémico y reducción de la esperanza de vida.

Tabla 1. Clasificación de las MPS.

Defectos en la degradación de Mucopolisacáridos			
Enfermedad	Otros nombres	Proteína lisosomal deficitaria	Sustratos acumulados
MPS I	Síndrome de Hurler, Scheie y Hurler/Scheie ^a	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 glucosamino-N-acetiltransferasa	Heparán sulfato
MPS IIID	Síndrome de Sanfilippo D	N-acetilglucosamina-6-sulfato 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 Maroteaux-Lamy	Arilsulfatasa B	Dermatán Sulfato
MPS VII	Síndrome de Sly	β -glucuronidasa	Heparán, Dermatán y Condroitín sulfato
MPS IX		Hialuronidasa	Ácido hialurónico

^aHurler: variante más severa; Scheie: variante más leve; Hurler/Scheie: variante moderada. Adaptado de (Wilcox 2004; Tollersrud and Berg 2005; Platt et al. 2018).

Todas las MPS son consideradas enfermedades raras, teniendo en cuenta su reducida incidencia a nivel global (Tabla 2). En cuanto al patrón de herencia, la mayoría de MPS son autosómicas recesivas, con la excepción de la MPS II que tiene una herencia ligada al cromosoma X. Al igual que en otras LSD, la correlación genotipo-fenotipo no siempre es evidente. Existen distintos grados de afectación dependiendo de la mutación genética que pueden dar lugar a una actividad enzimática residual variable (Cimaz et al. 2006; Muenzer 2011). Este es el caso de la MPS I, que puede presentarse con una forma severa (Hurler) o con una forma atenuada (Scheie). Esta gran variabilidad

en el fenotipo de los pacientes es la principal dificultad a la hora de realizar su diagnóstico (Cimaz and La Torre 2014).

Tabla 2. Incidencia global de los distintos tipos de MPS.

Mucopolisacaridosis	Incidencia Global (casos por cada 100.000 nacimientos)
MPS I (Síndrome de Hurler, Hurler/Scheie, Scheie)	0,69 - 1,66
MPS II (Síndrome de Hunter)	0,30 - 0,71
MPS III (Síndrome de Sanfilippo)	-
MPS IIIA (Síndrome de Sanfilippo A)	0,29 - 1,89
MPS IIIB (Síndrome de Sanfilippo B)	0,42 - 0,72
MPS IIIC (Síndrome de Sanfilippo C)	0,07 - 0,21
MPS IIID (Síndrome de Sanfilippo D)	0,1
MPS IV (Síndrome de Morquio)	-
MPS IVA (Síndrome de Morquio A)	0,22 - 1,30
MPS IVB (Síndrome de Morquio B)	0,02 - 0,14
MPS VI (Síndrome de Maroteaux Lamy)	0,36 - 1,30
MPS VII (Síndrome de Sly)	0,05 - 0,29
MPS IX (Síndrome de Natowicz)	4 casos descritos

Adaptado de (Muenzer 2011).

Actualmente, no existe ningún tratamiento efectivo para la mayoría de las MPS. Los tratamientos disponibles son paliativos y basados principalmente en el tratamiento sintomático. Las MPS poseen un espectro sintomatológico 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. Por ejemplo, se trata de enfermedades monogénicas de herencia recesiva, de manera que se conocen los genes alterados en cada una de ellas. Mediante herramientas de manipulación genética se pueden generar modelos animales (ratón, rata) de estas enfermedades humanas, alterando el gen equivalente en el animal para estudiar la fisiopatología de la enfermedad o realizar estudios preclínicos de una terapia contra la MPS.

Una gran ventaja para el tratamiento de estas enfermedades es que no es necesario recuperar la actividad total de la enzima lisosomal alterada para revertir la enfermedad. Se puede alcanzar un nivel de actividad terapéutico suficiente para disminuir el acúmulo lisosomal con un 10-40% de la actividad enzimática basal (Cheng and Smith 2003; D. P. W. Rastall and Amalfitano 2017).

Por último, otra característica favorable para el tratamiento de las MPS sería la posibilidad de la corrección cruzada o *cross-correction*. Esta corrección está basada en la propiedad de las enzimas lisosomales secretables para ser captadas a través del residuo M6P (Figura 2). Las enzimas lisosomales presentes en el riego sanguíneo o en el medio extracelular pueden ser incorporadas en otras células vía endocitosis mediada por los M6PR de la membrana plasmática. En este mecanismo se basan la mayoría de las aproximaciones terapéuticas basadas en la administración de proteínas recombinantes o en una terapia génica que posibilite la producción continua de la proteína terapéutica. Sin embargo, la corrección cruzada no puede llevarse a cabo si la proteína alterada es una enzima transmembranal que no se secreta, como por ejemplo ocurre en la MPS IIIC (Marcó et al. 2016).

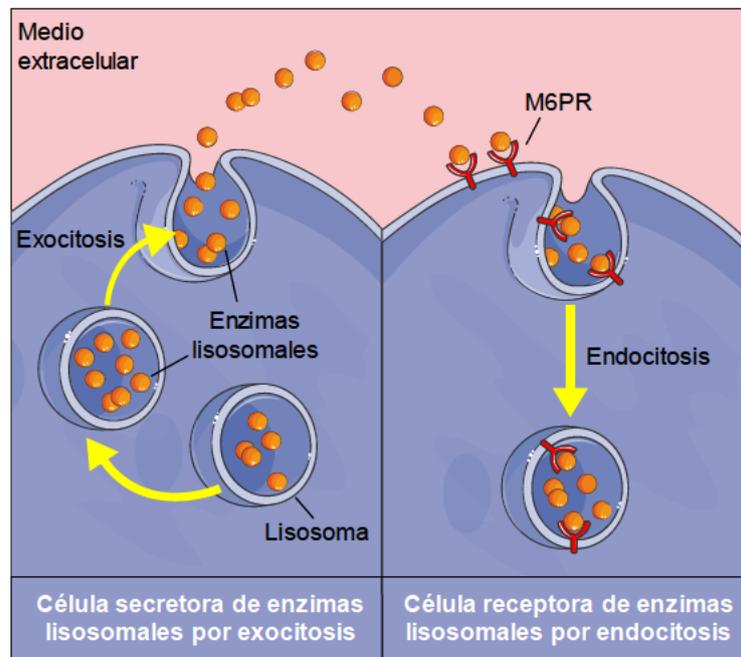


Figura 2. Mecanismo de corrección cruzada. Las enzimas lisosomales pueden llevar a cabo su función en la misma célula donde han sido sintetizadas o pueden ser secretadas al medio extracelular y al riego sanguíneo por exocitosis. Esto posibilita que otras células puedan captar dichas enzimas secretadas gracias a la unión con los M6PR de su membrana plasmática. Estas enzimas entrarán en la célula por endocitosis y podrán ejercer su función digestiva en los lisosomas de las células receptoras.

Basándose en estas características, el número de tratamientos avanzados que se están desarrollando para pacientes con MPS ha aumentado en los últimos años. Actualmente se dispone de trasplantes hematopoyéticos de células madre, terapias de reemplazo enzimático, reducción de sustratos, terapias con chaperonas y terapias génicas. A pesar de los notables avances, la eficacia de la mayoría de estas terapias es limitada, especialmente porque los tratamientos se inician cuando ya se ha producido un daño orgánico a causa de la acumulación lisosomal progresiva y no hay posibilidad de recuperación de las funciones perdidas (Schiffmann et al. 2008; Weidemann et al. 2009; Leone et al. 2012). Una complicación frecuente de los tratamientos que conllevan la introducción de proteínas no propias en el organismo es la respuesta inmune, que puede generar el paciente contra moléculas exógenas (Bali et al. 2012; Berrier et al. 2015). Otra dificultad es alcanzar los tipos celulares aislados, como por ejemplo cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) para alcanzar el sistema nervioso central (SNC) (D. Rastall and Amalfitano 2015) o alcanzar el cartílago avascular (Yangzi and Tuan 2015; Goldberg et al. 2017).

2.1. Glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAGs), conocidos también como mucopolisacáridos, son las estructuras glucídicas de los proteoglicanos, que se encuentran principalmente en el tejido conectivo, tejido óseo, medio intercelular y tejido epitelial. Las formas parcialmente degradadas de estos GAGs son las que se acumulan en el interior de los lisosomas de manera patológica en los distintos tipos de MPS (Muir 1969).

Los GAGs forman largas cadenas no ramificadas de heteropolisacáridos, compuestos por unidades repetitivas de disacáridos con una unidad básica general. Esta unidad básica consta de un amino azúcar (N-acetil-D-glucosamina o N-acetil-D-galactosamina) unido a un ácido glucurónico (D-glucurónico o L-idurónico), exceptuando el caso del Queratán sulfato (KS: *Keratan Sulphate*), en el que una galactosa ocupa el lugar del ácido glucurónico (Taylor and Gallo 2006) (Figura 3). Esta conformación confiere los GAGs una estructura resistente, gracias a los enlaces glucosídicos.

Los glicosaminoglicanos se clasifican según la estructura básica repetitiva de sus cadenas de polisacáridos en: (1) Heparán Sulfato, (2) Dermatán sulfato/Condroitín sulfato, (3) Queratán sulfato y (4) Ácido hialurónico. Durante su síntesis en el retículo endoplasmático, estos GAGs, a excepción del ácido hialurónico, sufren un gran número de modificaciones, como acetilaciones o sulfataciones, siendo estas últimas esenciales para su función específica.

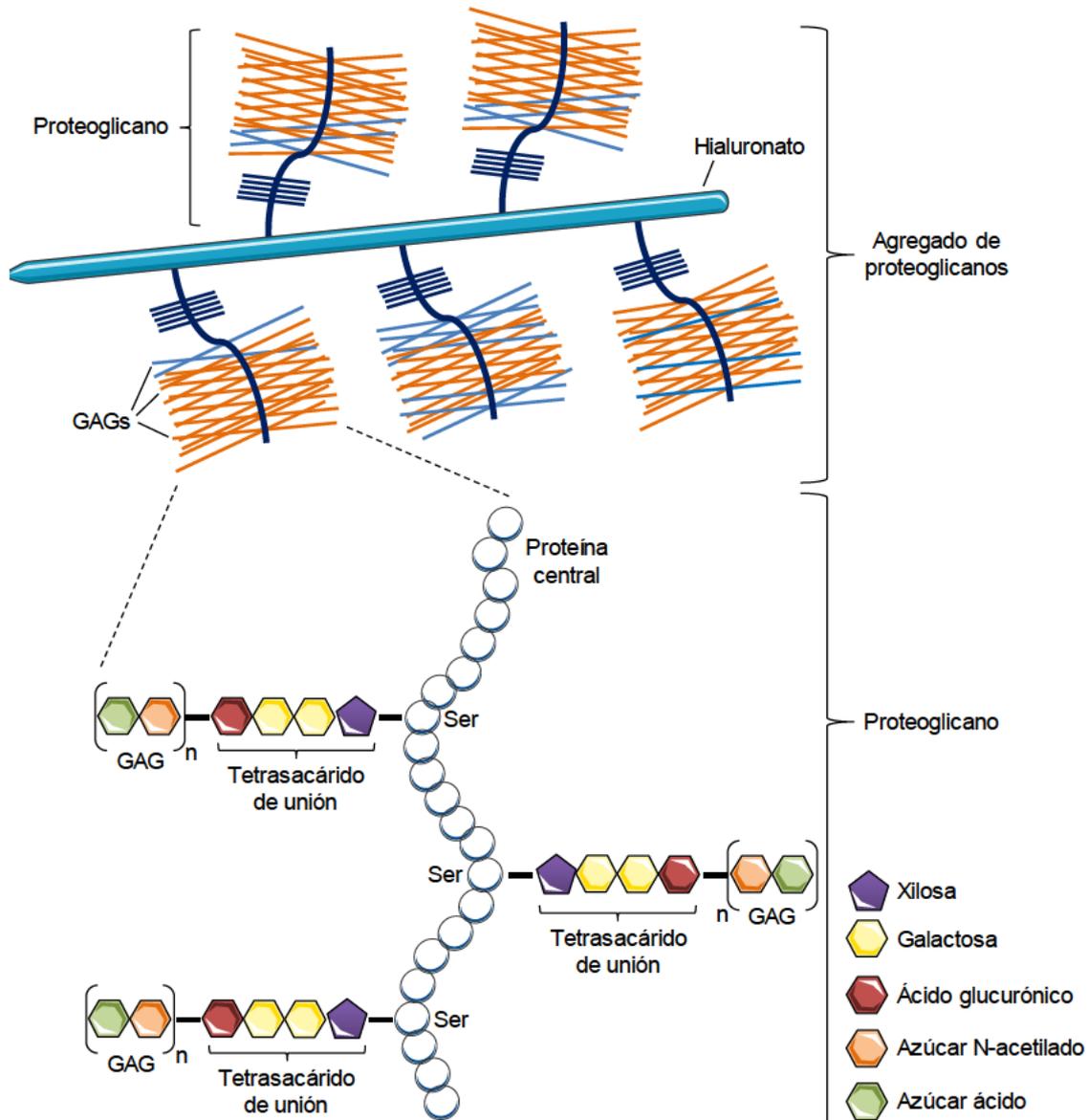


Figura 3. Estructura de los proteoglicanos. Los proteoglicanos están formados por un núcleo proteico unido covalentemente a polisacáridos denominados glicosaminoglicanos (GAGs). Estas cadenas están formadas por un tetrasacárido de unión, que se une a una serina de la proteína central, y de largos polímeros de carbohidratos repetitivos lineales (Amino azúcar + Azúcar ácido repetidos n veces) que están cargados negativamente debido a la presencia de grupos sulfato. Los proteoglicanos se unirán al ácido hialurónico para formar un agregado de proteoglicanos. Ser: Serina.

3. MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA

La mucopolisacaridosis tipo IV (MPS IV), también llamada Síndrome de Morquio, se divide en dos subtipos, A y B, de herencia autosómica recesiva. Pese a que cada uno de ellos se produce por el déficit de una enzima específica, las manifestaciones clínicas de los dos subtipos son similares, por lo que se agrupan como MPS IV. El subtipo A, conocido como MPS IVA o Síndrome de Morquio A, es causado por la deficiencia de la enzima lisosomal N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS, EC 3.1.6.4) que genera una acumulación patológica de KS y de Condroitín-6-sulfato (C6S) (Singh et al. 1976). Por otro lado, el subtipo B, conocido como MPS IVB o Síndrome de Morquio B, es causado por la deficiencia de la enzima lisosomal β -Galactosidasa (β -Gal) que genera una acumulación de KS (Przybilla et al. 2019). La MPS IVA (95% de los individuos afectados por MPS IV) ocurre con más frecuencia que MPS IVB (5% de los individuos afectados).

El primer caso de MPS IVA fue descrito en 1929 por el pediatra L. Morquio (C.J. Hendriksz et al. 2013). Al igual que en otras LSD, la mayoría de los pacientes con MPS IVA nacen aparentemente sanos y los síntomas se desarrollan progresivamente. Los síntomas iniciales aparecen entre los 2-3 años de edad y la edad media de diagnóstico es alrededor de los 4-5 años (Colmenares-Bonilla and Esquitin-Garduño 2017). Las principales alteraciones son esqueléticas e incluyen: baja estatura, hipoplasia de la apófisis odontoide, *pectus carinatum*, cifosis, escoliosis, *genu valgum*, *coxa valga*, ensanchamiento de las costillas inferiores, articulaciones hipermóviles y marcha anormal con tendencia a caer (A. M. Montaña, Tomatsu, et al. 2007). Otras complicaciones potenciales incluyen compromiso pulmonar, cardiopatía valvular, pérdida de audición, hepatomegalia, opacidad corneal, rasgos faciales toscos y dientes ampliamente espaciados con hipoplasia de esmalte y caries frecuentes. A pesar de presentar alteraciones a nivel del SNC, los pacientes de MPS IVA conservan el coeficiente intelectual normal (Davison et al. 2013).

La tasa de progresión de la enfermedad y las alteraciones patológicas son variables entre los pacientes. La patología de la MPS IVA se define como grave si la altura final del paciente está por debajo de 120 cm, como intermedia si la altura final está por encima de 120 cm y por debajo de 140 cm, y como leve si la altura mínima está por encima de 140 cm (Nelson, Broadhead, and Mossman 1988; A. M. Montaña, Tomatsu, et al. 2007). La esperanza de vida suele ser hasta la segunda/tercera década de vida, pese a que pacientes afectados por formas leves de la enfermedad han logrado alcanzar los 70 años de edad (A. M. Montaña, Tomatsu, et al. 2007; S. Tomatsu et al.

2011). Esta variabilidad clínica puede estar relacionada con múltiples factores, como la naturaleza de la mutación, el origen étnico o las diferencias en la atención médica que recibe el paciente.

3.1. Prevalencia de la MPS IVA

La estimación de la prevalencia de la MPS IVA, al igual que de otras enfermedades raras, se complica debido al elevado número de pacientes mal diagnosticados y a la gran variabilidad fenotípica que hay dentro de la propia enfermedad. Al tratarse de una condición rara, los datos existentes sobre prevalencia son escasos y variables. Se estima que la prevalencia de la MPS IVA es de aproximadamente 1/250.000, pero la incidencia varía ampliamente según el área geográfica estudiada y la consanguinidad, tal y como muestra la Tabla 3.

Tabla 3. Prevalencia de la MPS IVA por países.

País	Prevalencia por nacimiento	Por cada 10.000	Consanguinidad	Período de estudio
Australia (KOL)	1 por 253.000	0,04*	NR	1980–2013
Alemania	1 por 263.000*	0,0380*	NR	1980–1995
Emiratos Árabes Unidos	1 por 71.000	0,14*	Si	1995–2010
Australia	1 por 201.000	0,0497*	NR	1980–1996
Canadá (BC)	1 por 207.000*	0,048*	NR	1972–1996
Japón (POR)	1 por 500.000	0,02*	NR	1991–2011
Australia Oeste	1 por 641.000	0,0156*	NR	1969–1996
Países Bajos	1 por 459.000*	0,022*	NR	1970–1996
Taiwán	1 por 304.000	0,033*	NR	1984–2004
Irlanda del Norte	1 por 76.000	0,13*	NR	1958–1985
Brasil (KOL)	1 por 1.179.000*	0,009*	NR	2004–2013
Canadá (BC)	1 por 216.000	0,046*	NR	1952–1986

Abreviaciones: BC: British Columbia, KOL: Key Opinion Leader, POR: Patient organisation representative, NR: No registrado, *Calculado por autores. Adaptado de (Leadley et al. 2014).

3.2. Enzima N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS)

3.2.1. Gen codificante para la proteína GALNS humana

Un primer estudio realizado en 1991 aisló, caracterizó y analizó la expresión del DNA complementario (cDNA) codificante para la enzima N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS) humana (S. Tomatsu et al. 1991). Posteriormente, en 1993, se mapeó el gen *GALNS* en el locus 16q24.3 (Baker et al. 1993).

El gen *GALNS* humano está formado por 14 exones y 13 intrones, abarcando aproximadamente 50 kb (Shunji Tomatsu, Montañó, et al. 2005). El promotor endógeno de *GALNS* carece de una caja TATA, pero contiene secuencias ricas en cajas GC, algo característico de los promotores de genes *housekeeping*. Por ello, el gen *GALNS* se expresa en múltiples tejidos y tipos celulares (Figura 4). El cDNA de *GALNS* tiene un marco de lectura abierto de 1566 pb, que codifica una proteína de 522 aminoácidos con un péptido señal de 26 residuos aminoacídicos (Fukuda et al. 1992).

Expresión del gen *GALNS* humano



Figura 4. Expresión del gen codificante de *GALNS* en diferentes tejidos. Se presentan histogramas representativos de la expresión de *GALNS* en *Homo sapiens* analizado por RNA-Seq. La expresión se midió en RPKM (*reads per kilobase per million reads placed*). Datos obtenidos en 2019 del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2588> y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/292073>.

3.2.2. Enzima *GALNS*

La enzima lisosomal *GALNS* es una sulfatasa cuya función es la de hidrolizar el grupo éster del sulfato del extremo no reducido de la galactosa-6-sulfato en el caso del

KS y el grupo éster del sulfato del extremo no reducido de la N-acetilgalactosamina-6-sulfato del C6S (Figura 5) (Fukuda et al. 1992).

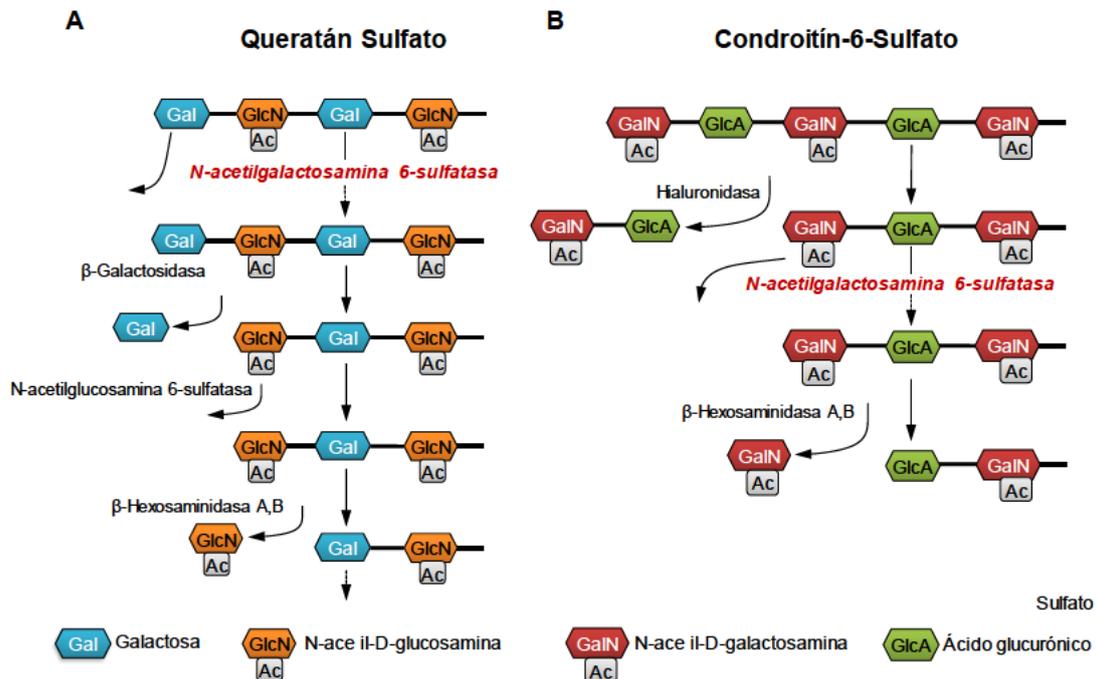


Figura 5. Degradación enzimática del Queratán sulfato y del Condroitín-6-sulfato. (A, B) Esquemas representativos de la degradación gradual de los GAGs Queratán sulfato (A) y Condroitín-6-Sulfato (B). Adaptado de (Neufeld and Muenzer 2001).

Esta enzima se purificó por primera vez en 1979 a partir de placenta humana (Gloessl, Truppe, and Kresse 1979). Gracias a un estudio cristalográfico realizado en 2012, a partir de células de mosquito productoras de proteína GALNS recombinante, se obtuvo por primera vez la información estructural de GALNS (Rivera-Colón et al. 2012). Esta enzima es un homodímero de 120 kDa, con monómeros de 60 kDa que son procesados en dos polipéptidos con un peso molecular de 40 kDa y 15 kDa unidos por un enlace disulfuro. Cada monómero incluye un centro activo en el extremo N-terminal (Dominio 1, residuos 28-379), un segundo dominio formado por una hoja β antiparalela (Dominio 2, residuos 380-481) y un último dominio en el extremo C-terminal (Dominio 3, residuos 482-510) que penetra en el dominio 1, formando el centro activo de la proteína (Figura 6).

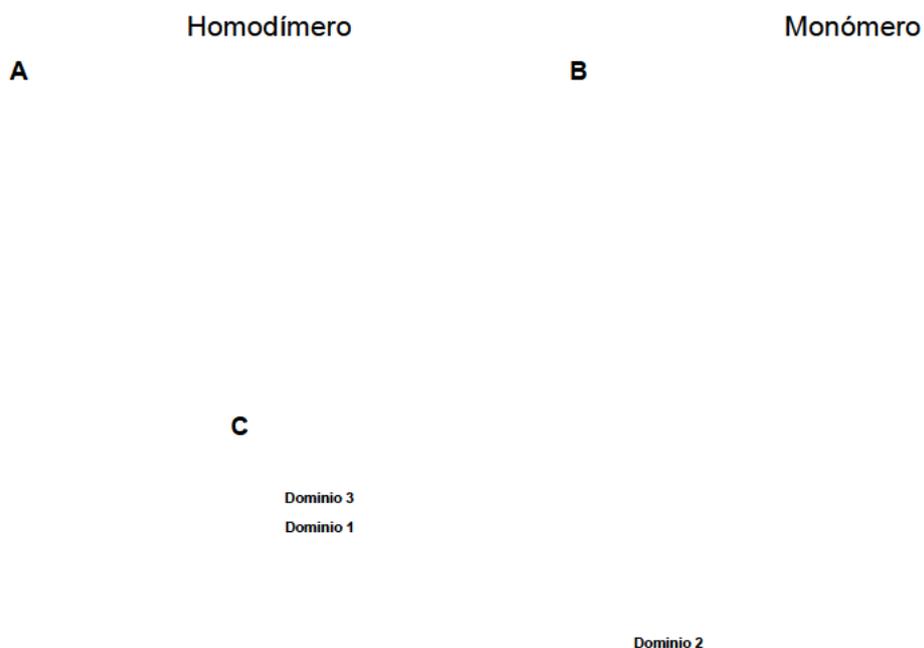


Figura 6. Estructura proteica de la enzima GALNS humana. (A) Vista general de la estructura del dímero GALNS. **(B)** Vista ortogonal del monómero GALNS. El centro activo presenta una región de unión a Ca^{2+} (círculo magenta). **(C)** Imagen representativa de los tres dominios del monómero de GALNS. *Adaptado de (Rivera-Colón et al. 2012).*

Cada monómero de la enzima GALNS humana presenta 2 lugares de glicosilación en residuos de asparagina (Asn 204 y Asn 423) y 7 cisteínas, de las cuales 6 forman 3 puentes disulfuro (Cys 308-419, Cys 489-518 y Cys 501-507), exceptuando la Cys 79. El papel de esta Cys 79 es importante para el correcto funcionamiento del centro activo de la GALNS y por ello está altamente conservada en otras especies. Durante las modificaciones post-traduccionales, esta Cys 79 se modifica a formilglicina por actuación de la enzima SUMF1 (*Sulfatase Modifying Factor 1*), hecho que conlleva a la activación catalítica en la familia de enzimas de tipo sulfatasa (Cosma et al. 2003; Rodríguez et al. 2010). La forma madura de GALNS se acaba estabilizando en un complejo con otras tres enzimas: β -Galactosidasa, α -Neuraminidasa y Catepsina A. La unión de estas enzimas forma un complejo multienzimático lisosomal, necesario para el correcto catabolismo del queratán sulfato (Pshezhetsky and Potier 1996).

La enzima GALNS está altamente conservada a nivel de secuencia proteica entre especies, incluso en aquellas alejadas filogenéticamente (Figura 7). En cuanto a los roedores, también existe una elevada identidad en la secuencia aminoacídica de GALNS, alcanzando valores de 85,8% con la de ratón (*M. musculus*) y la de rata (*R.*

norvegicus). Esto sugiere que su actividad sulfatasa se ha mantenido a lo largo del tiempo y su función será similar entre especies.



Figura 7. Análisis comparativo de la secuencia proteica GALNS entre especies. Árbol filogenético (*Neighbour-joining tree*) sin correcciones de distancia calculado con *Clustal Omega* a partir del alineamiento de las secuencias proteicas de GALNS de distintas especies.

3.2.3. Mutaciones en el gen GALNS humano

Hasta febrero de 2018, se han descrito 334 mutaciones en el gen *GALNS* (*Human Gene Mutation Database*). Existe un amplio espectro de tipos de mutaciones, pero las más frecuentes son las mutaciones de tipo *missense* (Figura 8). Las mutaciones *missense* son aquellas en las que el cambio nucleotídico da lugar a un cambio de aminoácido en la proteína. Por tanto, la secuencia proteica final es idéntica a la normal, a excepción del aminoácido alterado. Otro tipo de mutaciones detectadas en pacientes de Morquio A son de las tipo *nonsense*, donde la mutación genera la aparición de un codón STOP prematuro. De esta manera, se generará una proteína truncada, ya que la secuencia aminoacídica no se traducirá por completo. Además de estos tipos de mutaciones, también existen mutaciones en sitios de *splicing*, pequeñas inserciones o deleciones, grandes inserciones/duplicaciones y reordenamientos complejos (Morrone et al. 2014). El porcentaje que ocupa cada tipo de mutación asociada al Síndrome de Morquio A se representa en la Figura 8. Esta amplia variedad de mutaciones puede afectar a diferentes regiones de la proteína, como el centro activo, la región hidrofóbica o la superficie de la enzima, y pueden dar lugar a diferentes alteraciones que resultan en fenotipos diversos (A. M. Montaña, Sukegawa, et al. 2007; Rivera-Colón et al. 2012).

El tipo de mutación depende del área geográfica estudiada. En todo el mundo, las diez alteraciones del gen *GALNS* descritas con mayor frecuencia en pacientes con Morquio A se ven representadas en la Tabla 4. De todas las mutaciones identificadas, el 79% son mutaciones *missense*, que llevan a la deficiencia de la actividad de la enzima *GALNS*, dando lugar a la enfermedad MPS IVA. Dentro de las mutaciones *missense*

existen tres mutaciones que se presentan con elevada frecuencia: p.Arg386Cys, p.Ile113Phe y p.Gly301Cys (Figura 8).

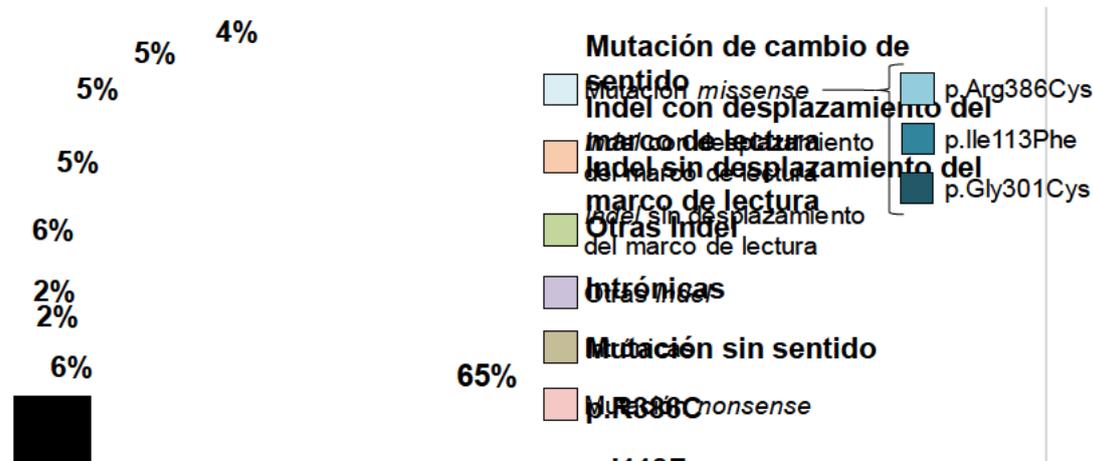


Figura 8. Porcentaje de los distintos tipos de mutaciones descritas en pacientes con Morquio A. El 79% de las mutaciones asociadas a Morquio A son mutaciones *missense*. Dentro de este porcentaje, existen tres mutaciones *missense* de alta frecuencia, la p.Arg386Cys (5%), p.Ile113Phe (5%) y p.Gly301Cys (4%), mientras que el resto de las mutaciones *missense* ocupa el 65% de las mutaciones totales. Adaptado de (Morrone et al. 2014).

Tabla 4. Distribución por área geográfica de las mutaciones más frecuentes de la enzima GALNS descritas en pacientes con MPS IVA.

Mutaciones	Nº pacientes afectados	Porcentaje total de la mutación	Porcentaje respecto a todas las mutaciones	Mutaciones	Nº pacientes afectados	Porcentaje total de la mutación	Porcentaje respecto a todas las mutaciones
p.Arg386Cys	55	100	5	p.Ala291Thr	20	100	1,8
España	9	16	0,8	Asia	8	40	0,7
Argentina	6	11	0,5	Gran Bretaña	4	20	0,4
China	5	9	0,5	Finlandia	3	15	0,3
Italia	4	7	0,4	Pakistán	2	10	0,2
Colombia	3	5	0,3	China	1	5	0,1
Polonia	3	5	0,3	Japón	1	5	0,1
Turquía	3	5	0,3	Otros	1	5	0,1
Chile	3	5	0,3	p.Ser287Leu	20	100	1,8
Otros	14	35	1,3	Medio este	4	20	0,4
p.Ile113Phe	52	100	4,8	Turquía	3	15	0,3
Irlanda	27	52	2,5	España	2	10	0,2
Gran Bretaña	15	29	1,4	Polonia	2	10	0,2
Gran Bretaña/Irlanda	3	6	0,3	Grecia	2	10	0,2
Otros	7	13	0,6	Macedonia	2	10	0,2
p.Gly301Cys	45	100	4,1	Austria	1	5	0,1
Colombia	16	36	1,5	Nueva Zelanda	1	5	0,1
Portugal	6	13	0,5	Irlanda/Italia/Polonia	1	5	0,1
España	5	11	0,5	Otros	2	10	0,2
Otros	10	40	0,9	p.Met318Arg	19	100	1,7
c.120+1G>A	22	100	2	China	11	58	1
Túnez	20	91	1,8	Taiwán	3	16	0,3
Otros	2	9	0,2	Otros	2	11	0,2
p.Thr312Ser	22	100	2	Sud-este asiático	2	11	0,2
Irlanda	14	64	1,3	Japón	1	5	0,1
Gran Bretaña/Irlanda	3	14	0,3	p.Arg253Trp	18	100	1,6
Otros	5	23	0,5	Pakistán	16	89	1,5
p.Met391Val	22	100	2	Otros	2	11	0,2
Francia/Canadá	7	32	0,6				
Francia	4	18	0,4				
Canadá	3	14	0,3				
Alemania	2	9	0,2				
Otros	6	27	0,5				

Adaptado de (Morrone et al. 2014).

De todas las mutaciones de la Tabla 4, la más frecuente es la mutación *missense* p.Arg386Cys, en la que se substituye una Arginina por una Cisteína en la posición 386 de la secuencia proteica de GALNS (Figura 9). En humanos, este cambio de aminoácido corresponde al cambio de una Citosina en la posición 1156 por una Timina (c.1156C>T) (Fukuda et al. 1996). El cambio de aminoácido en esta posición está asociado a una forma severa de la enfermedad (Shunji Tomatsu, Montaña, et al. 2005).

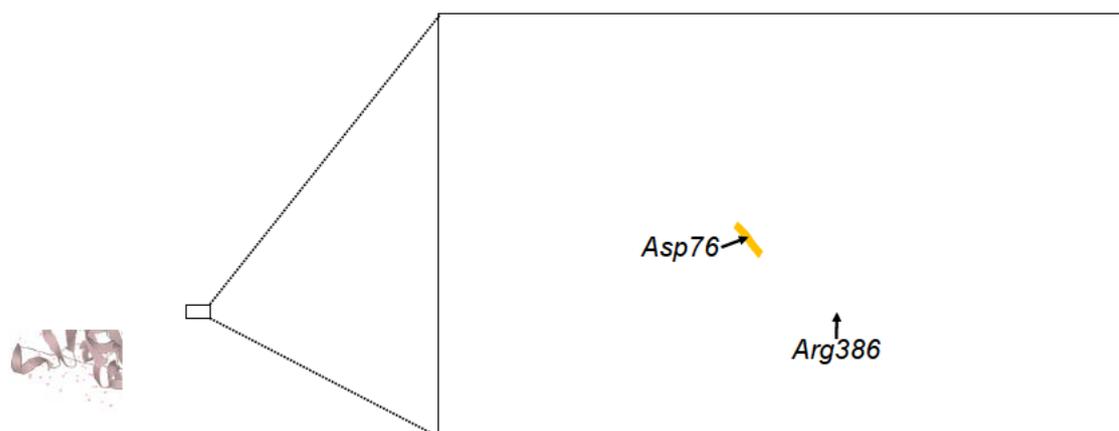


Figura 9. Localización de la Arginina 386 en la estructura tridimensional de la enzima GALNS humana. Una mutación *missense* en esta posición genera una alteración en el enlace de hidrógeno entre la arginina 386 y la asparagina 76, llevando a la deficiencia de GALNS y a un fenotipo severo en humanos. Obtenido de la base de datos *UniProt* (<https://www.uniprot.org/uniprot/P34059>).

3.3. Correlación genotipo-fenotipo

Entre los individuos con MPS IVA existe un alto grado de heterogeneidad genética que se traduce en un amplio espectro de progresión de la enfermedad (C.J. Hendriksz et al. 2013). A pesar de la variabilidad molecular de las mutaciones, se han observado algunas asociaciones genotipo-fenotipo en varios estudios (A. M. Montaña, Sukegawa, et al. 2007).

Los fenotipos observados en los pacientes con MPS IVA varían desde la forma clásica, con una displasia ósea severa, estatura baja, pérdida auditiva, afectación de las válvulas cardíacas, opacidad corneal y una esperanza de vida de 20 a 30 años; hasta la forma atenuada, con manifestaciones más leves y una mayor esperanza de vida. Actualmente, se han descrito 31 alteraciones genéticas asociadas con un fenotipo más atenuado y 101 alteraciones genéticas asociadas a un fenotipo grave (Shunji Tomatsu, Montaña, et al. 2005). Por ello, dependiendo del tipo de mutación y del efecto que tenga sobre la actividad enzimática de la enzima GALNS, se puede presentar un fenotipo más severo u otro más atenuado, tal y como muestra la Tabla 5 (Düng et al. 2013).

Otros estudios determinaron que las mutaciones *missense* tenían una correlación genotipo-fenotipo más clara dependiendo del grado de conservación evolutiva del residuo alterado en GALNS (Düng et al. 2013; Olarte-Avellaneda et al. 2014). Sin embargo, a pesar de las correlaciones genotipo-fenotipo de los estudios anteriores, actualmente aún es difícil establecer una buena correlación dada la gran heterogeneidad alélica y la amplia variabilidad clínica de los pacientes, dificultando el pronóstico preciso de los casos individuales.

Tabla 5. Asociación genotipo-fenotipo de las diez mutaciones más frecuentes de la enzima GALNS reportadas en pacientes de Morquio A.

Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Tipo de mutación	Fenotipo MPS IVA
c.1156C>T	p.Arg386Cys	Missense	Severo
c.337A>T	p.Ile113Phe	Missense	Severo
c.901G>T	p.Gly301Cys	Missense	Severo
c.120+1G>A	-	Mutación en región de <i>splicing</i>	No reportado
c.935C>G	p.Thr312Ser	Missense	Atenuado
c.1171A>G	p.Met391Val	Missense	Atenuado
c.871G>A	p.Ala291Thr	Missense	Severo
c.860C>T	p.Ser287Leu	Missense	Severo
c.953T>A	p.Met318Arg	Missense	Severo
c.757C>T	p.Arg253Trp	Missense	Atenuado

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

3.4. Acción biológica del Queratán Sulfato

El KS es un GAG sulfatado que se encuentra principalmente en la córnea, el cartílago y el tejido óseo. Las moléculas de KS están altamente hidratadas y actúan principalmente en las articulaciones como amortiguador para absorber el choque mecánico o en la córnea para mantenerla hidratada y transparente.

En el cartílago, el KS representa el 25% de los GAGs que forman la matriz extracelular (MEC) cartilaginosa (Düng et al. 2013). Allí, el KS se une al agrecano, el principal proteoglicano del cartílago, aunque también se puede encontrar unido al lumicán. El agrecano es un componente esencial para mantener la estructura y la resistencia del cartílago. La unión covalente del KS al agrecano es necesaria para la correcta organización extracelular de la molécula y de la matriz cartilaginosa. Por otro lado, cuando el KS se une al lumicán, participa en varias funciones celulares, como la migración celular (Saika et al. 2003).

En el hueso, el KS es también uno de los GAGs principales, al igual que en la córnea, donde representa el 65% del total de GAGs (Gipson, Joyce, and Zieske 2004). Además, el KS se encuentra en otros tejidos del cuerpo, como en la MEC de las válvulas cardíacas, los pulmones, la glándula tiroidea, el tracto genital femenino y en las glándulas mamarias. Este GAG también tiene un papel importante en el SNC, dado que participa en el desarrollo y en la formación de la cicatriz glial tras una lesión o en el desarrollo axonal de neuronas (Miller, Sheppard, and Pearlman 1997; H. Zhang, Uchimura, and Kadomatsu 2006).

Existen tres tipos de KS, el KSI, el KSII y el KSIII, denominados originalmente en función del tipo de tejido a partir del cual se aislaron. El KSI se aisló del tejido corneal y el KSII del tejido esquelético (Funderburgh 2000). Las principales diferencias se producen en el enlace con el que cada tipo de KS se une a la proteína central del proteoglicano. El KSI se encuentra N-unido al aminoácido asparagina a través de la N-acetilglucosamina, en cambio, el KSII está O-unido a los aminoácidos específicos serina o treonina a través de la N-acetil galactosamina (Nieduszynski et al. 1990). También se aisló un tercer tipo del tejido cerebral, el KSIII, que está unido a aminoácidos específicos de serina o treonina a través de la manosa (Krusius et al. 1986).

3.5. Acción biológica del Condroitín-6-Sulfato

El Condroitín Sulfato (CS) es un GAG sulfatado compuesto por una cadena repetitiva de disacáridos de N-acetilgalactosamina y ácido glucurónico. El CS es necesario para el mantenimiento de la integridad estructural de los tejidos con una gran MEC, como el cartílago, tejido conectivo, piel, vasos sanguíneos, ligamentos y tendones. En el cartílago, el CS es el componente mayoritario y aporta las propiedades mecánicas y elásticas, proporcionando resistencia a la compresión.

Dependiendo de la edad y de la región del cartílago estudiada, existen distintos tipos de CS, clasificados en función de su patrón de sulfatación en: no sulfatado, 4-sulfato (C4S) o 6-sulfato (C6S) (Bayliss et al. 1999). El C6S se encuentra principalmente en el líquido sinovial y en el cartílago (Heimer et al. 1992; Ling et al. 1996), además del tejido conectivo, piel, ligamentos, tejido neural, córnea, vasos y células sanguíneas (Y. Zhang et al. 2005; Yasuda et al. 2013; Shimada et al. 2014).

La función del C6S puede ser de tipo estructural o de tipo regulador, dependiendo del proteoglicano del cual forma parte. El elevado nivel de agregación y las fuertes cargas de los grupos sulfato del C6S permiten la retención del agua a estos

proteoglicanos. Esta propiedad permite que el cartílago articular pueda soportar fuerzas compresivas y posibilite un movimiento libre de dolor en las articulaciones (Bathe et al. 2005). En los condrocitos y células sinoviales, el C6S también participa en la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (Jomphe et al. 2008; Tan and Tabata 2014). En la piel, el principal proteoglicano de unión al 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).

3.6. Fisiopatología de la MPS IVA

En la MPS IVA, como consecuencia de la acumulación continuada de C6S y KS en los lisosomas, se inicia una disfunción celular que da lugar a una enfermedad multisistémica. Dado que la mayor parte de estos GAGs son producidos por los condrocitos, los sustratos no degradados se acumulan principalmente en estas células y en la matriz extracelular del cartílago y de los tejidos óseos (Yasuda et al. 2013; Doherty et al. 2018). Otros tejidos alterados son la córnea, la tráquea, las válvulas cardíacas y la aorta (Y. Zhang et al. 2005; Yasuda et al. 2013; Shimada et al. 2014).

Los huesos largos crecen por un proceso conocido como osificación endocondral. Este proceso es esencial para el crecimiento longitudinal de los huesos largos y concluye con la creación de tejido óseo a partir de la destrucción del tejido cartilaginoso (Figura 10). En pacientes con Morquio A, las células del cartílago están vacuoladas a causa de la distensión lisosomal, generando así una condrogénesis y/o osificación endocondral anormal de los huesos largos (Shunji Tomatsu et al. 2014). Esto tiene un impacto directo en el desarrollo del cartílago y del hueso, lo que lleva a una displasia esquelética sistémica en los pacientes.

En pacientes jóvenes de MPS IVA (entre 5 y 15 años de edad) existe una clara correlación entre los niveles de KS y el fenotipo óseo observado. Mientras que los pacientes con un fenotipo severo muestran una mayor presencia de KS en sangre y orina, aquellos pacientes con un fenotipo más atenuado muestran una presencia menor de KS (Düng et al. 2013). Estos elevados niveles de KS en sangre son debidos a que, durante la etapa de crecimiento, hay una elevada síntesis de KS en las placas de crecimiento, tanto en humanos sanos como en pacientes con MPS IVA. En cambio, el desarrollo óseo se reduce significativamente entre los 15 y 20 años, por lo que la correlación entre los niveles de KS y el fenotipo se pierde. La sustitución del cartílago

de crecimiento por matriz ósea durante el crecimiento provoca una reducción de la síntesis de KS y, por lo tanto, en los niveles circulantes de KS (Düng et al. 2013).

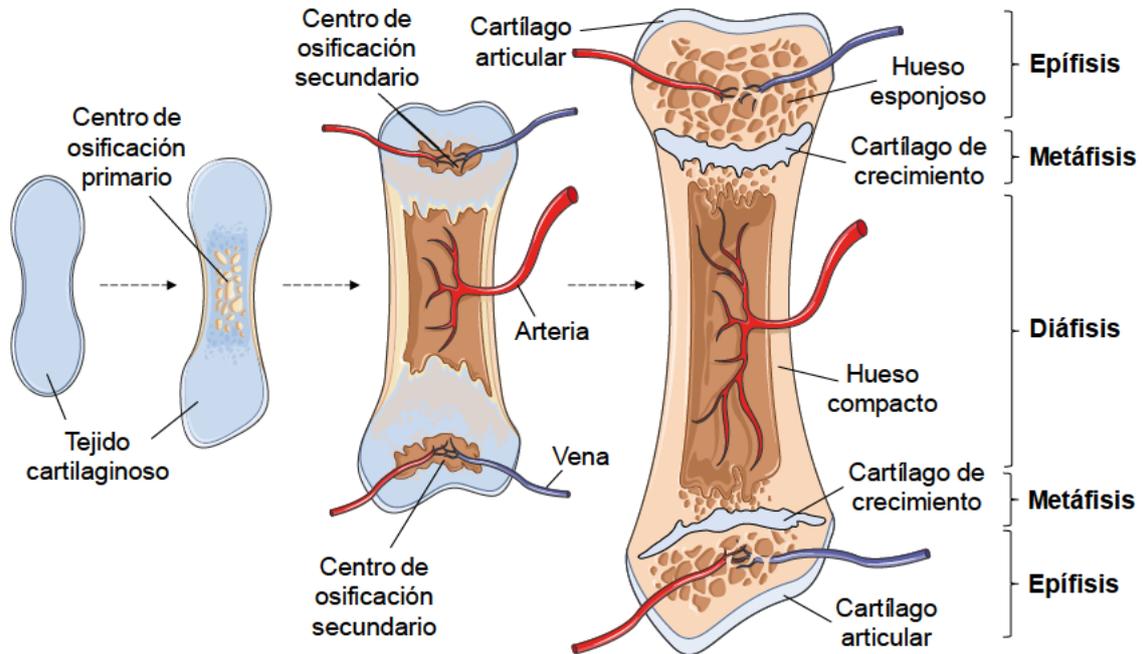


Figura 10. Proceso de osificación endocondral. El tejido cartilaginoso fetal (izquierda) es sustituido progresivamente por tejido óseo en el centro de osificación primario. Posteriormente, se forman dos centros de osificación secundarios en las epífisis de los huesos largos. A medida que el cartilago de crecimiento es sustituido por tejido óseo nuevo, los huesos largos crecen de manera longitudinal, hasta llegar a la etapa adulta, en la que el cartilago de crecimiento acaba desapareciendo.

En cuanto a los niveles de KS detectados en orina, estos proceden del filtrado de la sangre en el riñón, por lo que resultan en moléculas más pequeñas que las detectadas en la sangre. Sin embargo, en el 10-20% de los pacientes los niveles de GAGs de orina están dentro de los límites normales, lo que pueden ocasionar un diagnóstico erróneo del paciente (Düng et al. 2013).

Por otro lado, los niveles de C6S circulantes también son significativamente más elevados en los pacientes con MPS IVA en comparación con los sujetos control de la misma edad (Shimada et al. 2014). Dichos niveles de C6S también son más altos al nacer y disminuyen progresivamente con la edad (Shimada et al. 2014). Otros estudios demostraron que el CS total disminuye con la edad en el cartílago humano (Elliott and Gardner 1979), sugiriendo que el C6S también participa en el desarrollo óseo.

En conjunto, los niveles de KS y C6S en sangre son útiles como biomarcadores para diagnosticar y monitorizar a los pacientes de Morquio A. Actualmente, existen varias técnicas para cuantificar los niveles de KS y C6S en suero y orina, pero la que ha

proporcionando resultados más precisos dada su elevada sensibilidad, es la espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS) (Shimada et al. 2014; 2015).

3.7. Sintomatología de la MPS IVA

El Síndrome de Morquio A es una enfermedad multisistémica que afecta a varios órganos del cuerpo. Los signos clínicos más frecuentes de esta enfermedad se resumen en la Figura 11.

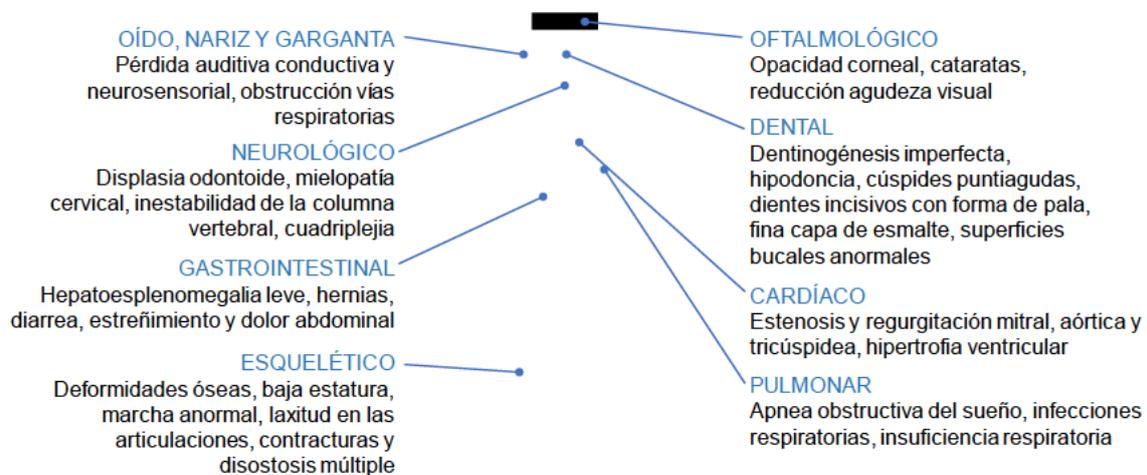


Figura 11. Principales alteraciones de la MPS IVA. Imagen representativa de los distintos órganos y sistemas afectados que generan los signos clínicos característicos de la enfermedad de Morquio A.

3.7.1. Síntomas iniciales

Al igual que otras MPS, la mayoría de los pacientes de Morquio A nacen aparentemente asintomáticos y los problemas aparecen de forma progresiva con el paso del tiempo. El tipo de mutación que presente el paciente afectará a la aparición de los primeros síntomas y a su severidad. Dado que se trata de una enfermedad con alteraciones en el crecimiento óseo, los pacientes con fenotipos severos empiezan a mostrar anomalías esqueléticas entre el primer y el tercer año de vida (A. M. Montaña, Tomatsu, et al. 2007). En cambio, los pacientes con fenotipos más atenuados empiezan a mostrar los primeros signos clínicos en la adolescencia.

3.7.2. Alteraciones esqueléticas

Una de las principales características de los pacientes de MPS IVA es la displasia esquelética (A. M. Montaña, Tomatsu, et al. 2007; S. Tomatsu et al. 2011; C.J. Hendriksz et al. 2013; Harmatz et al. 2014). Entre las principales alteraciones esqueléticas encontramos:

- Baja estatura: por problemas en la osificación endocondral de los huesos largos.
- Genu valgo: deformidad caracterizada porque el muslo y la pierna se encuentran desviados, de tal manera que forman un ángulo hacia afuera en el eje diafisario femoro-tibial en el plano frontal. Esta alteración postural hace que ambas extremidades se junten y los tobillos se separen.
- Coxa valga: deformidad de la cadera donde el ángulo formado entre la cabeza del fémur y su diáfisis está aumentado.
- Trastornos de la marcha: derivados de las anomalías en las extremidades.
- Hiperlaxitud de las articulaciones.
- *Pectus carinatum*: es una deformidad de la caja torácica en la que el pecho protruye en forma de quilla de barco por la presencia de un esternón protuberante.
- Cifosis: es una curvatura anormal de la columna vertebral de convexidad posterior.
- Hipoplasia odontoide: es generada por la falta o el desarrollo incompleto de la apófisis odontoide que deja la médula espinal desprotegida. Este hueso se encuentra entre la primera y segunda vértebra, y se encarga de estabilizar los movimientos de la cabeza hacia adelante y atrás.
- Complicaciones espinales: derivadas de la compresión cervical generada por la fusión de las vértebras cervicales o por la hipoplasia odontoide.
- Craneosinostosis: algunos pacientes sufren este defecto de nacimiento en el cual se produce el cierre prematuro de las articulaciones fibrosas (suturas craneales) que se encuentran entre los huesos del cráneo (Bhattacharya et al. 2014).
- *Facies tosca*: Deformidades típicas de la cara.

3.7.3. Alteraciones articulares

El cartílago articular protege los huesos de las articulaciones, permitiendo que estos se deslicen uno sobre el otro. En las enfermedades articulares degenerativas, tales como la artrosis, se produce un deterioro y una pérdida temprana del cartílago articular (Figura 12). Una fase clave en el proceso degenerativo artrósico es la pérdida de proteoglicanos (formados básicamente por condroitín sulfato) del cartílago y la exposición de la matriz ósea al roce mecánico. Esto provoca dolor, hinchazón y rigidez,

dando lugar al trastorno articular más común, la osteoartritis (OA). La pérdida temprana del cartílago articular no solo afecta al tejido óseo, sino que también genera una inflamación de la membrana sinovial, causando una patología conocida como sinovitis que habitualmente se encuentra asociada a la OA (Mathiessen and Conaghan 2017).

El desgaste del cartílago articular también puede ser causado por problemas en la condrogénesis articular. Los pacientes con MPS IVA sufren una condrogénesis alterada a causa de la acumulación de C6S y KS parcialmente degradados en los lisosomas. Esto puede ocasionar una OA temprana, especialmente en las extremidades inferiores, dado que son las que más presión soportan (Figura 12) (S. Tomatsu et al. 2011; Shunji Tomatsu et al. 2014). En las articulaciones de la cadera, la OA es destructiva y lleva a una restricción severa del movimiento. Las deformidades del acetábulo y la pelvis dificultan la cirugía protésica, por lo que muchos pacientes se ven obligados a ir en silla de ruedas debido a la dislocación de la cadera y al dolor (S. Tomatsu et al. 2011; Shunji Tomatsu et al. 2014).

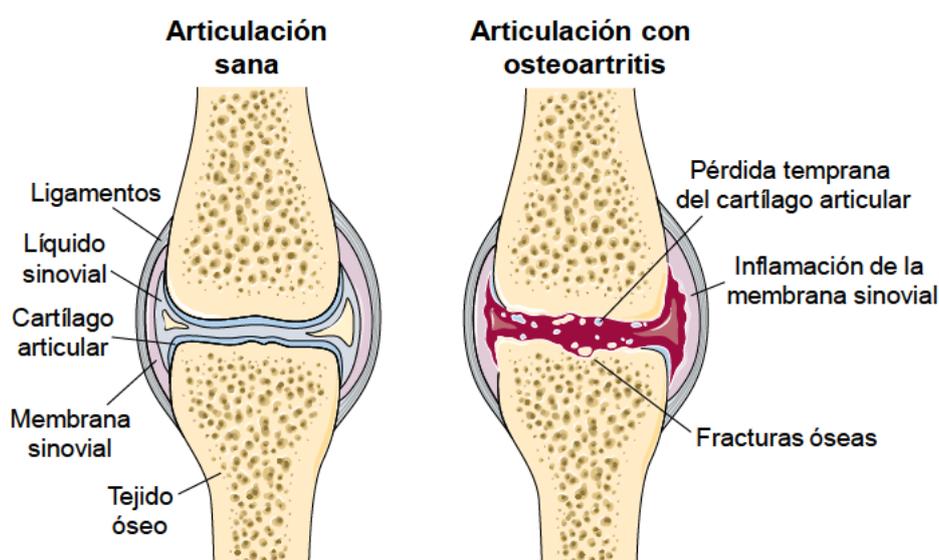


Figura 12. Signos de osteoartritis derivados de la alteración del cartílago articular. La acumulación de GAGs en los condrocitos del cartílago articular genera una alteración en este tejido. Esto conlleva una pérdida temprana del cartílago articular, generando fracturas óseas por el roce entre huesos de la articulación e inflamación de la membrana sinovial.

3.7.4. Alteraciones dentales

Otra característica típica de la enfermedad de Morquio A son las anomalías dentales, como fragilidad dental y la deficiencia en la producción de esmalte (Figura 13) (De Santana Sarmiento et al. 2015). Se ha descrito que los defectos del esmalte asociados con la pérdida de la actividad de GALNS en pacientes con MPS IVA podrían

derivarse de la acumulación patológica de KS y C6S en los lisosomas de los ameloblastos secretores de dicho esmalte (Lustmann 1978; Yamakoshi et al. 2002).

Los ameloblastos se encuentran en la base de los dientes y su función es la de generar y organizar el esmalte que refuerza y protege los dientes. Tras completar la formación del esmalte, los ameloblastos involucionan y desaparecen durante la erupción dentaria por apoptosis. La hipoplasia del esmalte desprotege los dientes, haciéndolos más frágiles y vulnerables a fracturas e infecciones bacterianas (Figura 13). Por esta razón, los pacientes de Morquio A tienen una tasa de aparición de caries mayor a la de la población sana (James, Hendriksz, and Addison 2011).

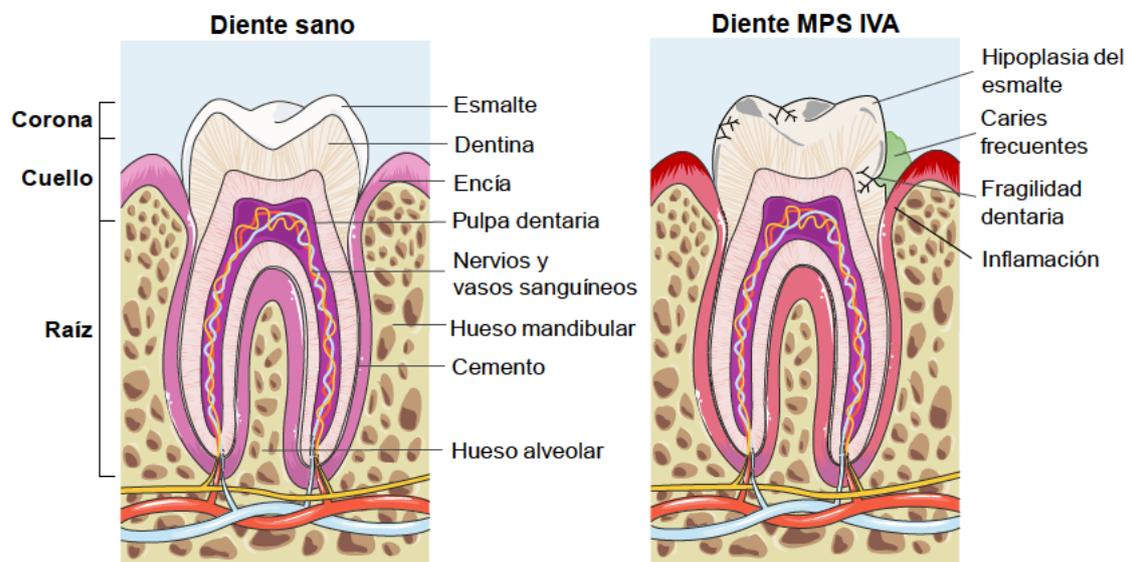


Figura 13. Problemas dentales en pacientes de MPS IVA. La deficiencia de esmalte deja a la dentina desprotegida, facilitando la aparición de fracturas dentarias e infecciones bacterianas.

3.7.5. Alteraciones orgánicas

Pese a que los tejidos óseos sean los que muestran signos patológicos más evidentes, el Síndrome de Morquio A es una enfermedad multisistémica que afecta a muchos otros sistemas, órganos y tejidos no esqueléticos como son, entre otros, el respiratorio, el cardíaco, el visual y el auditivo.

3.7.5.1. Alteraciones respiratorias

Los problemas respiratorios son una de las principales causas de muerte de los pacientes con MPS IVA (Theroux et al. 2012). Debido al *pectus carinatum* y a la fusión cervical, los pacientes de Morquio A tienen una caja torácica más pequeña que el resto

de población sana. Esto hace que el tamaño de la tráquea sea desproporcionado en la caja torácica, sufriendo curvaturas anormales que dificultan la respiración y la intubación de estos pacientes durante sus intervenciones quirúrgicas (Theroux et al. 2012). El estrechamiento traqueal severo se atribuye a la compresión por la arteria braquiocefálica, que es evidente desde los 2 años de edad (Doherty et al. 2018).

A nivel pulmonar, los pacientes de MPS IVA presentan una disminución del volumen pulmonar, también causado por el *pectus carinatum*, lo que conlleva a una disminución de la resistencia respiratoria y a un aumento de los episodios de apneas durante el sueño (Kubaski et al. 2015). Además, estos pacientes también sufren infecciones recurrentes del tracto respiratorio superior e inferior probablemente como resultado de alteraciones en el epitelio respiratorio (El Falaki et al. 2014; Pizarro et al. 2016).

3.7.5.2. Alteraciones cardíacas

Los pacientes de MPS IVA también sufren problemas cardiovasculares que pueden poner en riesgo su vida. Una autopsia realizada en un paciente de Morquio A reveló la presencia de material almacenado en células de la aorta y de las válvulas cardíacas (aórtica, mitral y tricúspide). Esta alteración puede generar una enfermedad valvular cardíaca que, sumada al hecho de presentar una capacidad pulmonar menor, contribuirá a restringir la función respiratoria y a limitar la actividad física (Yasuda et al. 2013; Kampmann et al. 2016).

Las deformidades del tórax, ocasionadas por el *pectus carinatum*, pueden resultar en un crecimiento inadecuado de la aorta. En los pacientes con MPS IVA, el ventrículo izquierdo es más pequeño, pero está relativamente engrosado, generando un aumento del ritmo cardíaco y unos patrones diastólicos deteriorados (Kampmann et al. 2016).

3.7.5.3. Alteraciones de la córnea

Otra característica típica de la MPS IVA es la opacidad corneal, donde la córnea muestra una apariencia blanca o nublada (Danes 1973). Esto hace que la córnea pierda su transparencia, reduciendo la luz que pasa a través de ella y llega a la retina. La opacidad corneal es debida a la acumulación de GAGs extracelulares en la superficie de la córnea a causa de un mal funcionamiento de los queratinocitos corneales que han

acumulado GAGs en su interior. Aunque esta característica clínica no sea severa, genera problemas visuales tales como el astigmatismo, la miopía o la hipermetropía (Couprie et al. 2010; C.J. Hendriksz et al. 2013).

3.7.5.4. Alteraciones de la capacidad auditiva

La reducción progresiva de la capacidad auditiva es una característica que comparten todas las MPS. La pérdida de la audición de leve a moderada en la MPS IVA aparece hacia el final de la primera década de vida, siendo la forma más común la mixta, es decir, conductora y neurosensorial (Nagao et al. 2018). Esta pérdida de audición conductiva es secundaria a infecciones recurrentes del oído medio, otitis media serosa y deformidad de los osículos. Por otro lado, se ha atribuido la pérdida auditiva neurosensorial secundaria a la acumulación de GAGs en el oído interno y/o el nervio auditivo (Simmons et al. 2005; C.J. Hendriksz et al. 2013; Nagao et al. 2018). Un estudio reciente encontró una correlación entre la baja estatura y la pérdida de audición, sugiriendo que los pacientes con displasia esquelética grave pueden tener un mayor riesgo de desarrollar una pérdida de audición más grave (Nagao et al. 2018).

3.7.5.5. Alteraciones hepáticas

El hígado también se ve afectado en pacientes con MPS IVA, dado estos presentan hepatomegalia debido al depósito de KS y C6S (Minami et al. 1979; Nelson, Broadhead, and Mossman 1988). La necropsia en un paciente de MPS IVA mostró que las células de Kupffer, macrófagos localizados en el hígado que forman las paredes de los sinusoides del sistema reticuloendotelial, se encontraban vacuoladas con signos de acumulación patológica de GAGs (Yasuda et al. 2013).

3.7.6. Fallecimiento del paciente

La insuficiencia respiratoria es la causa principal de muerte en pacientes con fenotipo grave de MPS IVA (63%), seguida de la insuficiencia cardíaca (11%), la insuficiencia orgánica postraumática (11%), complicaciones de la cirugía (11%) e infarto de miocardio (4%) (Peracha et al. 2018). Como resultado de estas complicaciones, los pacientes con fenotipo grave presentan una esperanza de vida más corta (Lavery and Hendriksz 2014). En cambio, los pacientes con la forma atenuada pueden sobrevivir hasta los 70 años si están bien controlados (S. Tomatsu et al. 2011).

3.8. Diagnóstico del Síndrome de Morquio A

3.8.1. Diagnóstico convencional

El diagnóstico de la MPS IVA es similar al diagnóstico de otras LSD. Se inicia con la sospecha clínica originada a partir de hallazgos clínicos, hallazgos radiográficos o una combinación de ambos. El análisis más utilizado es el de orina o sangre para determinar los niveles de GAGs y se realiza mediante:

- Aplicación de azul de dimetilmetileno en fluidos (Whitley et al. 1989). El problema de esta técnica es que no permite identificar el tipo de GAG que se detecta ya que tiñe todos los GAGs por igual, dando lugar a errores de diagnóstico.
- Cuantificación por ELISA con anticuerpos monoclonales específicos para cada GAG.
- Cuantificación específica de cada GAG mediante LC-MS/MS, la cual presenta una sensibilidad mucho mayor que los ELISAs (Shunji Tomatsu, Montaña, et al. 2010; Hintze et al. 2011).

Un nivel elevado de KS en orina o suero confirma la enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico exacto del síndrome se realiza midiendo la actividad enzimática de los leucocitos en la sangre o bien de los fibroblastos del cultivo de la piel del paciente. Para el análisis de actividad enzimática GALNS se pueden realizar los siguientes estudios:

- Mediante el uso de un sustrato sintético conjugado con el fluoróforo 4-MU (van Diggelen et al. 1990).
- Mediante el uso de sustratos cuantificables por LC-MS/MS (Mashima et al. 2018).

Una vez realizadas estas pruebas, se confirma la elevada concentración de KS y la baja actividad GALNS en los pacientes de MPS IVA (Wolfe et al. 2011). Un análisis molecular genético adicional permite la detección del tipo de mutación que da lugar a la enfermedad. En conjunto, para asegurar un correcto diagnóstico de la MPS IVA, se debe llevar a cabo: (1) una evaluación clínica de los síntomas, (2) el análisis de GAGs en orina y suero, (3) la determinación de actividad GALNS en pacientes con altas concentraciones de KS y (4) la confirmación genética del análisis bioquímico (Shunji Tomatsu et al. 2014; Cozma et al. 2015).

3.8.2. Diagnóstico postnatal

Al tratarse de una enfermedad progresiva, el diagnóstico precoz es necesario para evitar daños irreversibles a causa de la acumulación patológica continuada de

GAGs. Actualmente, se está investigando el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico para la detección de todas las MPS en niños recién nacidos. En el diagnóstico postnatal, por ejemplo, se están desarrollando *microarrays* específicos para detectar mutaciones en los genes o regiones relacionadas con la aparición de distintos síndromes o enfermedades. Estas micromatrices de DNA, junto a la NGS, están siendo ampliamente utilizadas como herramientas diagnósticas en el ámbito prenatal y postnatal de enfermedades raras (Brusius-Facchin et al. 2019).

El diagnóstico postnatal está centrado en la inmunocuantificación de enzimas lisosomales específicos (Matern et al. 2015; Chuang et al. 2017) o en el uso de la espectrometría de masas para la detección de los productos derivados de la reacción enzimática de GALNS en muestras de sangre seca (Khaliq et al. 2011; Smith et al. 2018; Mashima et al. 2018).

3.8.3. Diagnóstico prenatal

El diagnóstico genético prenatal consiste en la detección de anomalías genéticas antes del nacimiento, es decir durante el período fetal. Está indicado en parejas con antecedentes familiares o con algún hijo ya diagnosticado con MPS IVA. Hay tres maneras de realizar el diagnóstico prenatal:

- Biopsia de vellosidades coriónicas: se lleva a cabo entre las semanas 11 y 12 del embarazo. Si se desconoce la mutación causal de la enfermedad, se puede realizar un estudio de actividad enzimática GALNS a partir de un cultivo de las vellosidades coriónicas. Por otro lado, si se conoce la mutación causal, se puede obtener directamente el DNA de las vellosidades y realizar un análisis para confirmar la mutación (Zhao et al. 1990; Kleijer et al. 2000).
- Amniocentesis: es una de las pruebas más utilizadas para analizar las células presentes en el líquido amniótico y así determinar si el feto presenta anomalías genéticas. A partir de amniocitos cultivados se puede analizar el DNA para detectar la mutación causal. Si se desconoce la mutación, se puede realizar el análisis de la actividad enzimática de estos amniocitos cultivados. Además, el líquido amniótico permite la cuantificación de GAGs como prueba complementaria al diagnóstico (Mossman and Patrick 1982).
- Diagnóstico preimplantacional de embriones. Se basa en la extracción del DNA de una o varias células que conforman el embrión durante los días 3 y 6 del desarrollo embrionario. Sólo puede llevarse a cabo si se conoce la mutación causal de la familia afectada (Qubbaj et al. 2008).

3.9. Modelos animales de la MPS IVA

Los modelos animales de enfermedad se han utilizado ampliamente para el estudio de la fisiopatología de estas y para el desarrollo de nuevas terapias (Ruizo, Marcó, et al. 2012; Ribera et al. 2015; Motas et al. 2016). Actualmente, existen tres ratones modelo de MPS IVA: un modelo *Knock-out* (KO) y dos modelos *Knock-in* (KI) (Shunji Tomatsu et al. 2003; Shunji Tomatsu, Gutierrez, et al. 2005; Shunji Tomatsu, Vogler, et al. 2007).

El primer ratón KO homocigoto de GALNS se generó por interrupción del exón 2 del gen *Galns* murino. Este ratón KO no presenta actividad GALNS detectable en los tejidos periféricos y, en consecuencia, muestra un incremento de los niveles de KS en orina y en diversos órganos, como el cerebro, el hígado, el bazo y el riñón. A los 2 meses de edad, presenta signos de almacenamiento lisosomal en células de revestimiento sinusoidal y células de Kupffer del hígado. Sólo las células localizadas en la base de las válvulas cardíacas presentan alteraciones vacuolares, ya que cuando los ratones KO alcanzan los 12 meses de edad no muestran cambios vacuolares en hepatocitos o en células epiteliales tubulares renales. En el cerebro, los depósitos lisosomales almacenados solo se detectan en células meníngeas y en neuronas del neocórtex y del hipocampo. Además, también se observa un exceso de KS y C6S en el citoplasma de las células epiteliales de la córnea. Sin embargo, en comparación con los ratones sanos de tipo salvaje (WT: *Wild-type*), los ratones KO tienen una supervivencia similar y no muestran ningún signo de displasia esquelética (Shunji Tomatsu et al. 2003).

Otro ratón modelo de MPS IVA se generó por mutagénesis dirigida del gen *Galns*, reemplazando el gen de ratón endógeno por el gen *GALNS* humano mutado. Este modelo KI humanizado genera tolerancia y previene la reacción inmune contra la proteína GALNS humana en los ensayos de la terapia de reemplazo enzimático. Este modelo murino no muestra actividad GALNS, sin embargo, los niveles séricos de KS no son diferentes a los de los ratones WT. La acumulación de GAGs solo se detecta en los órganos viscerales, cartílago, hueso, córnea y cerebro. De manera similar al anterior modelo de ratón KO, los depósitos de almacenamiento lisosomal se detectan dentro de las células del revestimiento sinusoidal del bazo y en las células de Kupffer. A nivel de cartílago, los condrocitos muestran signos de almacenamiento lisosomal en el citoplasma. Esta distensión lisosomal también se detecta en el hueso, específicamente en osteocitos y osteoblastos. A pesar de esta acumulación lisosomal, no se detectan alteraciones radiográficas en las extremidades posteriores, la columna vertebral o las costillas de los ratones MPS IVA. Además, el análisis de microtomografía computarizada

(μ CT) de la densidad mineral ósea en fémur y tibia no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los ratones WT y MPS IVA. Pese a la acumulación de GAGs en los órganos viscerales y condrocitos, este modelo de ratón MPS IVA tolerante no muestra ningún signo de displasia esquelética (Shunji Tomatsu, Gutierrez, et al. 2005). Sin embargo, un estudio demostró que tras el cambio de fondo genético de mixto a C57BL/6J puro, se detecta una ligera desviación del calcáneo en los ratones MPS IVA (Rowan et al. 2013).

El tercer modelo de ratón MPS IVA es otro ratón KI generado al reemplazar la cisteína 76 por una serina en la GALNS murina por mutagénesis dirigida (Shunji Tomatsu, Vogler, et al. 2007). Los ratones MPS IVA homocigotos no presentan actividad enzimática GALNS y el almacenamiento lisosomal de GAGs en los órganos ya es evidente a los 2-4 meses de edad. Sin embargo, en este modelo tampoco se observaron cambios patológicos en los huesos.

En conjunto, a pesar de la acumulación de materiales no degradados en los lisosomas del hueso y el cartílago, ninguno de estos ratones modelo de MPS IVA desarrolla la patología ósea característica de los pacientes de Morquio A. Por este motivo, es necesaria la generación de nuevos modelos animales capaces de desarrollar la patología esquelética observada en los pacientes de Morquio A, con el fin de poder evaluar la eficacia terapéutica de los distintos tratamientos para revertir la patología esquelética y los demás tejidos clave alterados en la MPS IVA.

3.10. Tratamiento para la MPS IVA

Actualmente, no existe un tratamiento que sea capaz de revertir al 100% el fenotipo de la enfermedad de Morquio A. Los principales tratamientos disponibles son sintomáticos y están 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. Para el correcto tratamiento de los pacientes con MPS IVA son necesarias evaluaciones periódicas, curas de soporte y un equipo clínico multidisciplinario que pueda abordar la gran variedad de complicaciones, sobre todo a nivel de la displasia esquelética, las dificultades respiratorias y los problemas cardiovasculares.

3.10.1. Tratamiento sintomático

3.10.1.1. Complicaciones ortopédicas

Las alteraciones esqueléticas, como el *pectus carinatum*, cifoescoliosis o *genu valgum*, son las características clínicas más evidentes en los pacientes de MPS IVA. El 70% de los pacientes con un fenotipo severo desarrollan complicaciones musculoesqueléticas durante los primeros años de vida. Actualmente, la única solución para corregir la displasia esquelética es la cirugía ortopédica, principalmente a nivel cervical y de las extremidades inferiores (A. M. Montaña, Tomatsu, et al. 2007). La artroplastia total de cadera suele ser necesaria debido a la artritis severa y a la acumulación de contracturas de tejidos blandos (Ilyas et al. 2017).

3.10.1.2. Complicaciones respiratorias

La obstrucción de la tráquea es una de las principales complicaciones que aumentan el riesgo de muerte en estos pacientes, debido a las apneas, complicaciones derivadas y a la dificultad en la intubación durante la anestesia (Theroux et al. 2012; Shunji Tomatsu et al. 2016; Doherty et al. 2018). La única intervención capaz de corregir estas obstrucciones es la cirugía. El procedimiento quirúrgico, que incluye la reconstrucción traqueal y vascular, se puede realizar de forma segura y es muy eficaz para tratar la obstrucción de la vía aérea inferior en pacientes con el Síndrome de Morquio A (Pizarro et al. 2016; Shunji Tomatsu et al. 2016).

3.10.2. Trasplante de células madre hematopoyéticas

El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT: *Hematopoietic stem cell transplantation*) se basa en trasplantar células madre sanas y aprovechar la capacidad que tienen dichas células para diferenciarse y generar nuevas líneas celulares sanas en la médula ósea. Estas células sanas serán capaces de secretar la enzima GALNS activa para que ésta sea captada tanto por las células vecinas como las distantes. En 2005 la Sociedad Europea de Trasplantes de Sangre y Médula, desarrolló unas guías para llevar a cabo el HSCT en pacientes de MPS (Aldenhoven et al. 2015).

El HSCT se ha realizado en 4 pacientes con Morquio A (Chinen et al. 2014; Wang et al. 2016; Yabe et al. 2016). El trasplante no es rechazado por el receptor y se consiguen elevados niveles de actividad GALNS en linfocitos después del tratamiento. La restauración de la actividad GALNS permite una mejoría de la capacidad pulmonar,

de la capacidad locomotora y una disminución en el número de intervenciones quirúrgicas y de afecciones en las válvulas cardíacas. A nivel esquelético hay un incremento de la densidad ósea y un leve incremento en la estatura sólo cuando los pacientes se tratan a una edad temprana.

3.10.3. Terapia de reemplazo enzimático

La terapia de reemplazo enzimático (ERT: *Enzyme Replacement Therapy*) es un tratamiento médico basado en la administración intravenosa de la enzima GALNS recombinante (rGALNS). Esta enzima se produjo por primera vez en células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) (Shunji Tomatsu, Montaña, et al. 2007; Dvorak-Ewell et al. 2010) y, posteriormente, en *Escherichia coli* (Alejandra et al. 2013) y *Pichia pastoris* (Rodríguez-López et al. 2016). La administración intravenosa de rGALNS en estudios preclínicos demuestra tener una amplia biodistribución en los órganos periféricos. Sin embargo, la principal desventaja es su baja vida media en circulación, ya que la enzima es indetectable pasadas 48 h tras su administración (Shunji Tomatsu, Montaña, et al. 2007; Shunji Tomatsu et al. 2008; Dvorak-Ewell et al. 2010).

La rGALNS para uso clínico se produjo en células CHO y fue administrada de forma intravenosa en 20 pacientes en la fase I/II y en 176 en la fase III (Christian J Hendriksz et al. 2014; Christian J. Hendriksz et al. 2015). Durante la fase I/II del ensayo clínico, se determinó el efecto terapéutico de la ERT mediante el test de la marcha de 6 minutos (6MWT: *6 Minutes Walking Test*). En este estudio se observó una mejora en el resultado del 6MWT solamente en aquellos pacientes que fueron tratados con la dosis de 2 mg/kg semanalmente, mientras que los pacientes que la recibieron cada dos semanas no presentaron cambios estadísticamente significativos respecto al grupo placebo (Christian J Hendriksz et al. 2014). La administración semanal de rGALNS permitió una mejora en la capacidad locomotora y una reducción de la captación de oxígeno relativo al ejercicio (Burton et al. 2015). Además, la ERT permitió disminuir más de un 40% el contenido de KS en orina. Pese a la reducción de los niveles de KS en orina, no se observó una mejoría de la patología esquelética ni en la función de los condrocitos, por lo que este estudio demostró que los niveles de KS en orina no eran buenos indicadores de la mejoría de la patología ósea (Shunji Tomatsu et al. 2014; Sawamoto et al. 2016). Finalmente, en 2014, el tratamiento de reemplazo enzimático comercializado como *Elosulfase Alfa*, VIMIZIM® (*BioMarin Pharmaceutical Inc.*) fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA: *Food and Drug*

Aministration) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA: *European Medicines Agency*) para el tratamiento de la MPS IVA en la UE y en los EEUU.

En estudios posteriores al lanzamiento de la ERT para Morquio A se ha observado que el tratamiento con VIMIZIM® a largo plazo (> 5 años de seguimiento) no ha evidenciado ninguna mejora en el crecimiento en los pacientes con MPS IVA. Estos resultados demuestran que la ERT no es capaz de mejorar las alteraciones esqueléticas, incluso cuando el tratamiento se inicia a edades tempranas (Shunji Tomatsu, Doherty, and Stapleton 2019). Tampoco se han observado efectos terapéuticos en la audición, en el ecocardiograma o la opacidad corneal (Christian J Hendriksz et al. 2014; Christian J. Hendriksz et al. 2015; Shunji Tomatsu, Sawamoto, et al. 2015; Shunji Tomatsu, Doherty, and Stapleton 2019; Doherty et al. 2019). Además, el 100% de los pacientes generaron anticuerpos contra *Elosulfase Alfa* y más del 80% desarrollaron anticuerpos que bloqueaban la unión de la enzima recombinante con los M6PR. Sin embargo, no se ha documentado correlación entre la generación de anticuerpos y la eficacia clínica (Schweighardt et al. 2015). En el ensayo clínico, 25 de los pacientes presentaron efectos adversos graves, como reacciones de hipersensibilidad que se tradujeron en disnea, broncoespasmos, hipoxia, hipotensión, enrojecimientos, angioedema de la garganta, urticaria y síntomas gastrointestinales. Además, la ERT presentó efectos secundarios leves como: fatiga, vómitos, dolor de cabeza, náuseas, pirexia y dolor abdominal (Christian J Hendriksz et al. 2014; Christian J. Hendriksz et al. 2015; Burton et al. 2015).

3.10.4. Terapias en desarrollo

3.10.4.1. Terapia de aumento de actividad enzimática

Las terapias de aumento de actividad enzimática se basan en el uso de “chaperonas farmacológicas” con la finalidad de favorecer el plegamiento correcto de las enzimas defectuosas. Esto ofrece la posibilidad de aumentar la actividad residual de las enzimas lisosomales mutadas en las LSD, alcanzando así un nivel de actividad terapéutico suficiente para disminuir el acúmulo lisosomal (Schueler et al. 2004).

Un estudio *in vitro* realizado en fibroblastos de pacientes de Morquio A demostró que dos chaperonas (MoEIM-1 y MoEIM-2) eran capaces de unirse al centro activo de la GALNS e incrementar la actividad 24 h después de su administración, alcanzando niveles comparables a los de fibroblastos sanos. Estas moléculas también tienen la capacidad de alargar la vida media de la rGALNS administrada en la ERT. Por ello, se

ha propuesto administrar estas moléculas como coadyuvante a la terapia de reemplazo enzimático en aquellos pacientes MPS IVA con mutaciones que impiden el correcto plegamiento de GALNS (C. Alméciga-Díaz et al. 2018).

3.10.4.2. Trasplante de células madre mesenquimales de cordón umbilical

Las células madre mesenquimales humanas de cordón umbilical (hUMSC: *Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells*) tienen la capacidad de diferenciarse en células no hematopoyéticas. Estudios *in vitro* han demostrado que las hUMSC de individuos sanos son capaces de secretar la enzima GALNS al medio, donde puede ser captada por fibroblastos deficientes de GALNS, consiguiendo un incremento en la actividad enzimática suficiente para revertir la patología. Estas células se han inyectado en el estroma de la córnea de ratones MPS IVA con el objetivo de tratar la opacidad corneal (Flanagan et al. 2018), dado que han demostrado eficacia en la mejoría de los defectos de la córnea en otras enfermedades (Ziaei et al. 2017).

3.10.4.3. Terapia de degradación de sustrato

La terapia de degradación de sustrato se basa en la reducción de los acúmulos patológicos mediante su degradación por enzimas diferentes a la GALNS. Se ha observado que la administración intravenosa de 2 U/Kg de keratanasa, en ratones MPS IVA, es capaz de reducir los niveles de KS en suero y otros tejidos. La ventaja que posee es que puede actuar en un rango de pH muy amplio, siendo activa tanto en los lisosomas como en la MEC (Shunji Tomatsu et al. 2018).

4. TERAPIA GÉNICA

Dada la falta de un tratamiento eficaz que sea capaz de revertir la patología ósea y el resto de las alteraciones detectadas en la MPS IVA, es necesario el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas. La terapia génica es una de las alternativas más prometedoras de los últimos años para el tratamiento de LSD (Ruzo, Marcó, et al. 2012; Ribera et al. 2015; Motas et al. 2016; Sawamoto et al. 2018). En el caso de las LSD y de la mayoría de las enfermedades monogénicas, la terapia génica se centra en administrar la copia corregida del gen mutado con el fin de recuperar su función y de revertir el fenotipo patológico observado en los pacientes afectados (Naldini 2015).

4.1. Clasificación de los tipos de terapia génica

Existen dos tipos de terapia génica en función de la metodología utilizada: la terapia génica *ex vivo* y la terapia génica *in vivo*.

La terapia génica *ex vivo* consiste en obtener células de pacientes o donantes, generalmente células madre hematopoyéticas, modificarlas genéticamente *in vitro* utilizando un vector, y reintroducirlas en el paciente o modelo animal.

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

La terapia génica también se puede dividir en función del vector utilizado para la administración del material genético, en viral y no viral. Las estrategias de terapia génica no virales se basan en la administración de DNA desnudo mediante electrotransferencia o mediante 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 basada en vectores virales, derivados de virus salvajes, permite la introducción del material genético en el interior de las células diana. Estos vectores necesitan unirse a un receptor específico para entrar en la célula, de manera que existe una especificidad determinada por el órgano, tejido o célula diana. Este tipo de terapia génica es ideal para el tratamiento de enfermedades genéticas monogénicas, como las MPS, ya que posibilita una expresión de larga duración, la secreción de enzimas secretables al riego sanguíneo y su distribución por todo el organismo (*cross-correction*).

4.2. Vectores virales adenoasociados

Actualmente, los vectores virales más ampliamente utilizados en terapia génica *in vivo* son aquellos derivados de los virus adenoasociados (AAV: *Adeno-associated virus*), gracias a su excelente perfil de seguridad, su baja inmunogenicidad y su habilidad para mediar expresión del transgén de interés durante años en una amplia variedad de tejidos (Mingozzi and High 2011).

Los AAV constituyen un grupo de virus de la familia *Parvoviridae*, del género *Dependovirus*, y se descubrieron por primera vez como contaminantes en preparaciones de Adenovirus (Atchison, Casto, and Hammon 1965; Hoggan, Blacklow, and Rowe 1966). Estos AAV necesitan la coinfección de virus accesorios, como pueden ser los Adenovirus o los Herpesvirus, para completar su ciclo replicativo (Lentz, Gray, and Samulski 2012).

Los virus AAV no se han asociado con ninguna enfermedad humana o animal, aunque la mayoría de los humanos (>70%) son seropositivos para uno o más serotipos. Estas características de los AAV permiten que los vectores virales recombinantes derivados de ellos sean seguros y presenten baja probabilidad de aparición de efectos secundarios debidos a su administración en aproximaciones de terapia génica.

4.2.1. Estructura del genoma de los virus adenoasociados WT

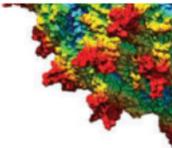
El AAV es un virus pequeño sin envuelta lipídica que contiene un genoma de DNA lineal de una sola cadena, de aproximadamente 4,7 kb de largo (R. Jude Samulski and Muzyczka 2014). El virus tiene una cápside icosaédrica de 25 nm de diámetro y es muy estable: resiste la exposición breve al calor, pH ácido y proteasas. Las regiones de codificación del AAV están flanqueadas por repeticiones terminales invertidas (ITR: *Inverted Terminal Repeats*) de 145 bases de largo y de una estructura compleja en forma de T (Figura 14). Estas repeticiones son los distintos orígenes de replicación del DNA y sirven como la principal señal de empaquetamiento. Las ITR son las únicas secuencias activas en *cis* del genoma viral necesarias para la fabricación de vectores AAV. Aunque las ITR del AAV tienen actividad *enhancer* en presencia de proteína Rep, también tienen una actividad promotora o *enhancer* mínima en su ausencia.

El genoma del AAV contiene tres marcos de lectura abiertos (ORF: *Open Reading Frame*) que codifican proteínas funcionales. El ORF de *rep* codifica cuatro proteínas Rep (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40) que se sintetizan a partir de los mRNA iniciados a partir de los promotores p5 y p19 (Figura 14). Las dos proteínas más grandes

(Rep78 y Rep68) tienen actividad endonucleasa, DNA helicasa y de ATPasa, que son necesarias para la replicación del DNA del AAV. Las dos proteínas Rep más pequeñas (Rep52 y Rep40) son necesarias para empaquetar el DNA en la cápside y sólo retienen el dominio helicasa que está presente en las proteínas Rep más grandes.

El promotor p40 controla un mRNA que por *splicing* formará las tres proteínas de la cápside. Las dos proteínas menores de la cápside, VP1 y VP2, contienen la misma secuencia de aminoácidos que la VP3, además de secuencias N-terminales adicionales para la infección. La proporción de VP1, VP2 y VP3 en la cápside es de aproximadamente 1:1:10. Además, el mRNA de VP2/VP3 codifica una proteína activadora de ensamblaje (AAP) en un marco de lectura diferente. La AAP facilita la importación nuclear de la VP3 y promueve el ensamblaje y la maduración de la cápside, pese a que no está presente en la cápside madura (Figura 14) (R. Jude Samulski and Muzyczka 2014).

A



B

Figura 14. Representación esquemática de la estructura del AAV. (A) Imagen tridimensional de la cápside del AAV generada por cristalografía a partir del AAV2. **(B)** Mapa genético del AAV WT donde se representan los genes *rep* y *cap* codificados en el genoma con sus promotores específicos. El material genético está flanqueado por las ITR, necesarias para el empaquetamiento del virus. *Adaptado de* (R. Jude Samulski and Muzyczka 2014).

Las proteínas de la cápside proteica son las que confieren la capacidad de unión al receptor y, por lo tanto, las que determinan el tropismo de cada serotipo (Tabla 6). Se han descrito multitud de serotipos diferentes de AAV humanos (serotipos 1, 2 y 5) y de primates (serotipos 7, 8, 9 y rh10), entre otros (G.-P. Gao et al. 2002; G. Gao, Vandenberghe, and Wilson 2005).

Tabla 6. Receptores, correceptores y tropismo de los principales serotipos de AAV.

Serotipo AAV	Receptor	Correceptor	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, endimocitos, 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, Gray, and Samulski 2012).*

El tráfico de las partículas víricas desde el medio extracelular al interior del núcleo no se conoce completamente, aunque parece que en algunos serotipos pueden estar mediado por endocitosis en vesículas con revestimiento de clatrina (Schultz and Chamberlain 2008). Una vez en el núcleo celular, la síntesis de la cadena complementaria de DNA viral requiere tanto de la maquinaria enzimática celular (Nash, Chen, and Muzyczka 2008) como de la expresión del gen viral *Rep*, dando lugar a las 4 proteínas Rep (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).

4.2.2. Producción de los vectores AAV recombinantes

Para producir los vectores virales derivados de los AAV se elimina el genoma viral codificante para las proteínas Rep y Cap, pero se mantienen las dos ITR necesarias para la encapsidación. El constructo de DNA de interés se coloca entre las ITR, sin superar el máximo de 4,7 kb de encapsidación. Además del gen de interés, se debe diseñar un *enhancer*, un promotor y una secuencia de poliadenilación apropiados para garantizar la expresión correcta de dicho gen (R. Jude Samulski and Muzyczka 2014). Al sustituir las proteínas virales se reduce considerablemente la acción del sistema inmunitario contra las células transducidas, pese a que se han descrito respuestas inmunes contra las cápsides de los vectores AAV en humanos (Manno et al. 2006; Mingozzi et al. 2009). Generalmente, la mayor parte de vectores virales utilizados en estudios de terapia génica utilizan el genoma del AAV2, dado que es uno de los serotipos mejor caracterizados (R. J. Samulski et al. 1982; Srivastava et al. 1989; R. Jude Samulski and Muzyczka 2014).

Los vectores AAV pueden ser producidos y purificados a títulos elevados en el laboratorio (Eduard Ayuso, Mingozzi, and Bosch 2010). La producción más utilizada es la del sistema de triple transfección utilizando 3 plásmidos (Figura 15). Un plásmido contiene el constructo de DNA de interés flanqueado por las ITR. Un segundo plásmido accesorio, sin ITR, codifica para las proteínas virales Rep y Cap. Ambos plásmidos se cotransfectan en células HEK293 juntamente con un tercer plásmido codificante para las proteínas adenovirales accesorias necesarias para la replicación de los vectores AAV. Con esta técnica se consigue encapsidar solamente el material genético localizado entre las ITR, evitando la encapsidación de los genes virales (Lai, Yue, and Duan 2010; Wu, Yang, and Colosi 2010). La combinación del gen Rep del AAV2 con el gen Cap de otros serotipos permite obtener partículas virales con las ITR del AAV2 pero con la cápside de otros serotipos, modificando así el tropismo del vector (Rabinowitz et al. 2002; Grimm et al. 2008).

El método más eficiente de purificación de vectores AAV, que separa las cápsides vacías de las que contienen genomas (cápsides llenas), es la purificación por gradiente de cloruro de cesio (CsCl) (E. Ayuso et al. 2010). Este método, descrito en nuestro laboratorio, utiliza el polietilenglicol (PEG) para precipitar y posteriormente el CsCl para purificar. Esto permite reducir significativamente las cápsides vacías y las impurezas de DNA y proteínas, lo que aumenta la pureza de la preparación viral y, por lo tanto, la eficiencia de transducción *in vivo* (E. Ayuso et al. 2010).

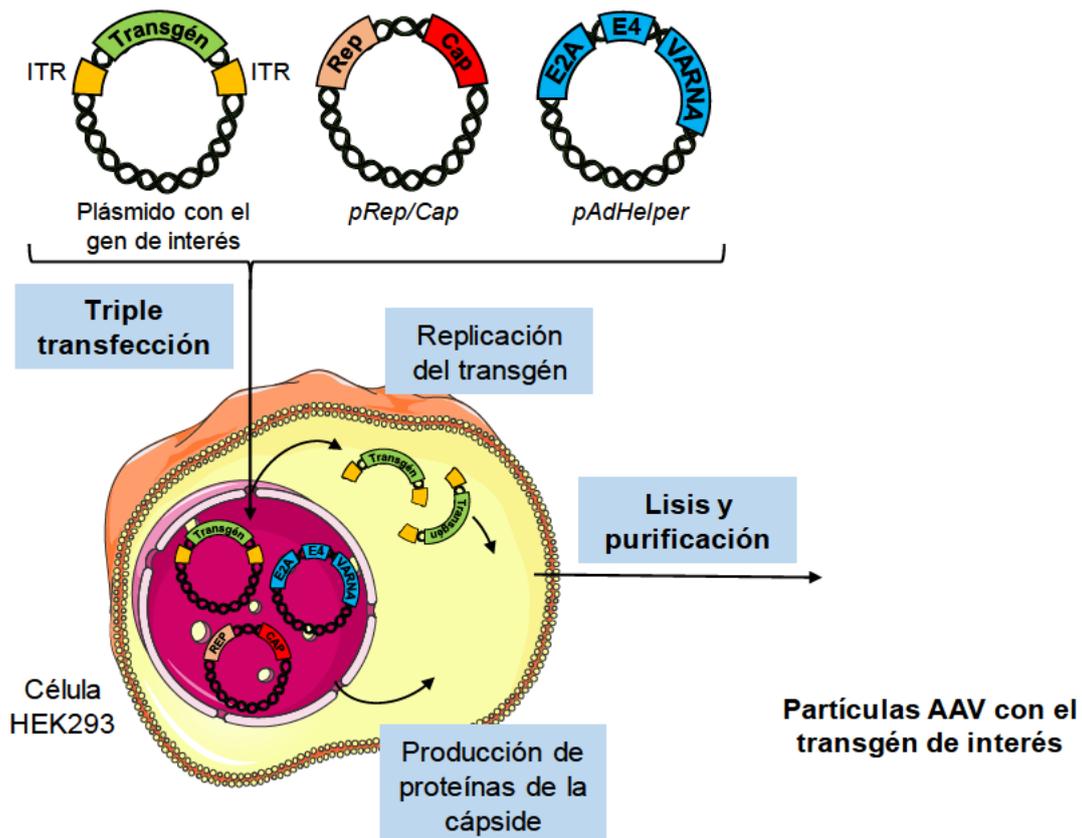


Figura 15. Producción de vectores AAV mediante el sistema de triple transfección en células HEK293. Para producir los vectores AAV se transfectan células HEK293 con tres plásmidos. Un plásmido contiene solamente el gen de interés flanqueado por las señales virales de empaquetamiento (ITR), el plásmido pRep/Cap aporta en *trans* las proteínas Rep y Cap y el tercer plásmido pAdHelper aporta las funciones propias de un virus auxiliar necesarias para la producción de los vectores AAV. Tras la replicación del DNA de interés y el empaquetamiento en las cápsides, las partículas de vector se purifican a partir del lisado celular con tal de obtener vectores terapéuticos para estudios de terapia génica. *Adaptado de (Eduard Ayuso, Mingozzi, and Bosch 2010).*

4.3. Terapia génica para la MPS IVA

En la actualidad no existe ningún ensayo clínico de terapia génica aprobado para el tratamiento de la MPS IVA. Al tratarse de una enfermedad monogénica, se han descrito aproximaciones de terapia génica en estudios preclínicos utilizando diversos vectores, como γ -retrovirus, lentivirus o AAVs.

4.3.1. Transferencia génica con vectores integrativos

En la primera aproximación de terapia génica para Morquio A se utilizó un vector retroviral que codificaba el gen *GALNS* humano (Toietta et al. 2001). El objetivo de este estudio fue transducir distintos tipos celulares, como fibroblastos y linfocitos de sangre periférica de individuos sanos y pacientes de MPS IVA, así como queratinocitos

humanos, mieloblastos de ratón y sinoviocitos de conejo. La administración del vector retroviral permitió alcanzar valores de actividad GALNS superiores a los de células sanas, así como una normalización de los niveles de GAGs en los tipos celulares transducidos.

Otro estudio *in vitro* utilizó vectores lentivirales portadores del gen *GALNS*. Estos vectores también fueron capaces de transducir fibroblastos de pacientes de Morquio A en cultivo, incrementando la actividad enzimática GALNS. En este tipo celular el tratamiento permitió la normalización de la actividad enzimática de otras dos enzimas lisosomales, la β -hexosaminidasa y la β -glucuronidasa, que han sido descritas como biomarcadores secundarios de la MPS IVA (Mejía 2012; Salazar et al. 2016).

4.3.2. Terapia génica con vectores AAV

Los primeros estudios preclínicos *in vitro* que utilizaron vectores AAV para tratar la MPS IVA utilizaron los promotores 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) para expresar la enzima GALNS humana en fibroblastos de pacientes de Morquio A (Gutiérrez et al. 2008; C. Alméciga-Díaz et al. 2009; C. J. Alméciga-Díaz et al. 2010). Esta transducción llevó a un incremento de la actividad GALNS y además, se observó que la co-expresión con *SUMF1* incrementaba aún más la actividad enzimática en el lisado celular, llegando a detectar una correcta secreción de la enzima en el medio de cultivo (C. J. Alméciga-Díaz et al. 2010).

Tras los estudios *in vitro*, se realizaron estudios *in vivo* de esta aproximación de terapia génica mediante la administración intravenosa de vectores AAV-hAAT-GALNS con y sin cotransducción con AAV-CMV-SUMF1 en ratones MPS IVA. Ambos casos permitieron un incremento de la actividad GALNS circulante, siendo la terapia de AAV-hAAT-GALNS+AAV-CMV-SUMF1 la que alcanzó mayores niveles de actividad enzimática, hasta un 20% más que los ratones WT tras 12 semanas desde la administración. Múltiples órganos se transdujeron exitosamente, como el hígado que alcanzó un incremento de actividad GALNS hasta el 21%, en los tratados con AAV-hAAT-GALNS, y el 37%, en los tratados con cotransducción con AAV-CMV-SUMF1+ AAV-hAAT-GALNS, respecto a los ratones WT. La coinyección de los vectores AAV-hAAT-GALNS y AAV-CMV-SUMF1 permitió un incremento de actividad GALNS del 30% en el corazón y del 33% en el hueso de ratones MPS IVA, mayores que los conseguidos sin la coadministración con *SUMF1* (C. Alméciga-Díaz et al. 2012).

Para mejorar la captación del vector al tejido óseo, la cápside se modificó mediante la inserción de múltiples secuencias peptídicas cortas. La inclusión de estas modificaciones confirió al vector afinidad por la hidroxiapatita (HA), el componente principal de la matriz ósea. El análisis *in vitro* de este vector demostró tener una afinidad por la hidroxiapatita del 100%. Además, el estudio *in vivo* en ratones inyectados con este vector permitió detectar niveles de transducción del hueso mucho más elevados que los observados con el vector no modificado, además de otros órganos periféricos como el hígado y el corazón (C. Alméciga-Díaz et al. 2012; Shunji Tomatsu, Alméciga-Díaz, et al. 2015).

En conjunto, las aproximaciones de terapia génica basadas en vectores AAV fueron capaces de incrementar los niveles de actividad GALNS, reduciendo los niveles de KS en los tejidos analizados. Sin embargo, estos estudios fueron realizados en ratones modelos de MPS IVA que no desarrollan la patología esquelética ni todas las alteraciones presentes en pacientes de Morquio A. Por ello, es necesaria la generación de nuevos modelos animales de la MPS IVA que desarrollen las alteraciones óseas y permitan testar la eficacia de nuevas aproximaciones terapéuticas.

5. GENERACIÓN DE MODELOS ANIMALES MEDIANTE CRISPR/CAS9

Actualmente, ninguno de los ratones modelo de la MPS IVA disponibles es capaz de desarrollar las principales alteraciones esqueléticas de los pacientes. Para diferentes enfermedades hereditarias, se ha observado que el modelo en rata desarrolla fenotipos más similares a las alteraciones patológicas observadas en pacientes humanos, en comparación con los modelos de ratón (Tessitore et al. 2008; Larcher et al. 2014; Byrne et al. 2019). En los últimos años, la edición genética ha facilitado la generación de modelos animales en organismos diferentes al ratón, como puede ser la rata. En el contexto de la MPS IVA, la edición genética supone una herramienta útil para la introducción de mutaciones asociadas a la enfermedad de Morquio A en el genoma de la rata.

Existen varias técnicas, basadas en el uso de nucleasas, para la edición del genoma como son las *zinc-finger nucleases* (ZFN) y las *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN). Sin embargo, el sistema que ha revolucionado el campo de la edición genética es el basado en la tecnología CRISPR/Cas9, por su versatilidad, eficiencia y facilidad de diseño (Hall et al. 2018; Lee, Sung, and Baek 2018).

5.1. Sistema CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 se basa en el uso de la nucleasa Cas9, la cual es capaz de realizar cortes de doble cadena en el genoma. Los cortes de doble cadena que realizan este tipo de nucleasas son cortes dirigidos, los cuales necesitan de secuencias CRISPR y secuencias PAM para llevarse a cabo (Mojica and Montoliu 2016).

Las secuencias CRISPR son repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), las cuales se identificaron por primera vez como un sistema de defensa bacteriano contra DNA extraño (Mojica and Montoliu 2016). Estas secuencias están compuestas por repeticiones cortas, seguidas por fragmentos cortos de DNA espaciador, procedentes de la exposición a diferentes patógenos. En procariontes estas secuencias se transcribirán dando lugar a secuencias de RNA capaces de reconocer con cierta homología un DNA exógeno. Estos RNAs formarán un complejo con la nucleasa Cas9 de la bacteria, permitiendo así el corte dirigido sobre el genoma del patógeno.

Las secuencias PAM o *protospacer adjacent motif* son secuencias necesarias para la unión de la nucleasa Cas9. Éstas son secuencias de 2-6 pares de bases y se

encuentran próximas a las regiones del genoma reconocidas por los RNA procedentes de las secuencias CRISPR. La nucleasa Cas9 realizará un corte de doble cadena aproximadamente 3 nucleótidos más allá de esta región.

De esta manera, las bacterias son capaces de protegerse de la infección por parte de otros microorganismos, ya que una vez se produzca esta infección, la nucleasa Cas9, unida a las secuencias de RNA derivadas de las secuencias CRISPR, será capaz de reconocer de forma específica el genoma del patógeno. Si este reconocimiento tiene lugar en una región del genoma del patógeno en el que se haya una secuencia PAM, la nucleasa podrá actuar y cortará el DNA exógeno.

5.2. Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 en la edición genética dirigida

Recientemente se ha descubierto el potencial del sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética para generar modificaciones específicas en el genoma, que se pueden aplicar a prácticamente cualquier organismo (Mojica and Montoliu 2016). Basándose en el principio de actuación del sistema CRISPR/Cas9 de bacterias se pueden diseñar RNAs sintéticos que actúen como guías (RNA guía o gRNA) en el reconocimiento de secuencias específicas del genoma.

La microinyección de estos gRNA juntamente con la nucleasa Cas9 en el pronúcleo de un embrión permitiría la formación de un complejo capaz de dirigir de forma guiada la rotura de doble cadena en una región específica del genoma. La reparación de este corte en el DNA podría dar como resultado la introducción de una pequeña mutación de inserción o deleción (Indel) por reparación de uniones de extremos no homólogos (NHEJ: *Non Homologous End Joining*), dando lugar a un animal *Knock-out*. Por otro lado, si conjuntamente a la microinyección del gRNA y la Cas9 se introduce un DNA con secuencias homólogas a la región de interés (DNA donante), el corte se puede resolver mediante reparación dirigida por homología (HDR: *Homology Directed Repair*), permitiendo la inserción de secuencias específicas en el genoma y generando así un animal *Knock-in* (Figura 16) (Hall et al. 2018).

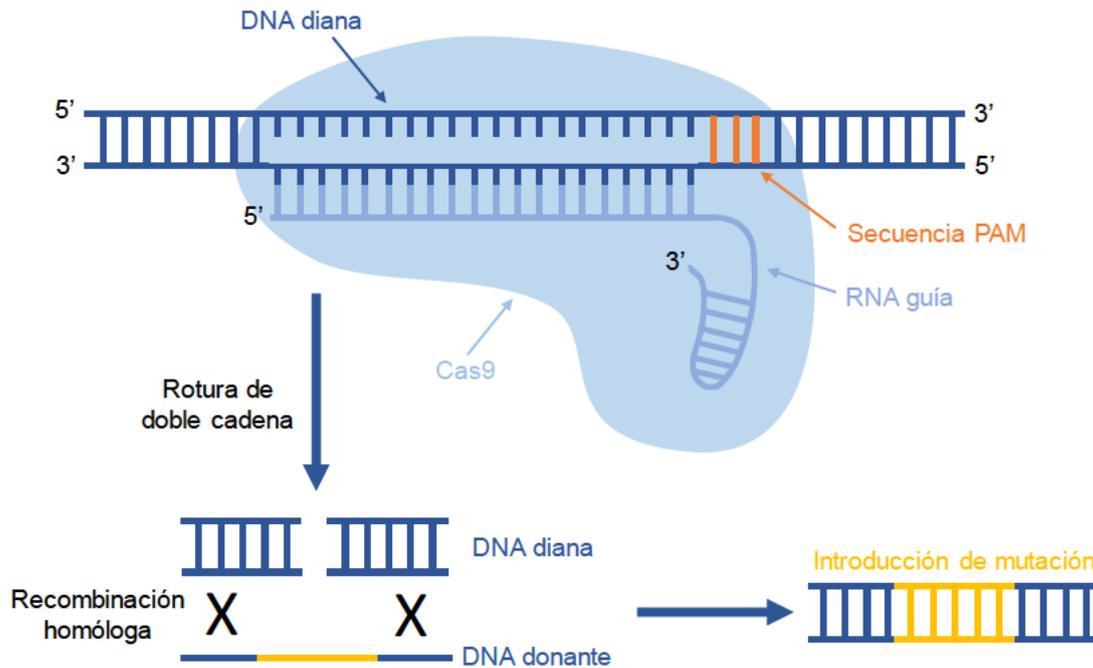


Figura 16. Representación esquemática del mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9. El RNA guía reconoce una secuencia específica del genoma y recluta a la nucleasa Cas9. Ésta realiza un corte de doble cadena aproximadamente 3 nucleótidos más allá de la secuencia PAM. En presencia de un DNA donante, se puede activar el sistema de reparación por recombinación homóloga e insertar material genético en el genoma.

Aunque la tecnología CRISPR/Cas9 presenta una elevada eficiencia de edición genética en la secuencia objetivo (*on-target*), este sistema también puede ocasionar mutaciones no deseadas cuando actúa en una secuencia “fuera del objetivo” (*off-target*) (Tsai et al. 2017; Wilson et al. 2019). Para minimizar el efecto de estos eventos no deseados en la generación de modelos animales, es importante realizar un diseño adecuado de la estrategia de edición génica, así como tener en cuenta la realización de cruzamientos en las primeras generaciones de animales generados por CRISPR/Cas9. De esta manera, las mutaciones *off-target* segregarán a través de los cruzamientos de los animales mutantes con animales WT. La caracterización de dos líneas de animales provenientes de fundadores independientes sería necesaria para valorar que el fenotipo observado en el modelo animal generado por CRISPR/Cas9 es sólo causado por la mutación específica introducida, y no por un evento *off-target* inespecífico (Iyer et al. 2015; Ayabe, Nakashima, and Yoshiki 2019).

Por lo tanto, la obtención de una rata modelo de la MPS IVA, mediante edición genética utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, podría dar lugar a un mejor modelo de Morquio A que presente las alteraciones más relevantes de los pacientes humanos. Si podemos disponer de un buen modelo animal, éste será muy útil para desarrollar nuevas aproximaciones de terapia génica para revertir la enfermedad.

III. Objetivos

La Mucopolisacaridosis tipo IVA (MPS IVA) es una enfermedad progresiva de depósito lisosomal caracterizada por una severa displasia esquelética y anomalías en la condrogénesis. Pese a que los tejidos óseos son los que muestran signos patológicos más severos, la MPS IVA es además una enfermedad multisistémica que presenta alteraciones a nivel cardíaco, respiratorio, dental y gastrointestinal. Actualmente, no existe un modelo animal que mimetice todos los signos clínicos de la MPS IVA humana. Por ello, es necesaria la generación de nuevos modelos animales que desarrollen las principales alteraciones patológicas de los pacientes Morquio A, para posteriormente poder ensayar nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad. En la actualidad, el único tratamiento aprobado para la MPS IVA es una terapia de reemplazo enzimático (ERT), pero esta terapia no es capaz de revertir los problemas de crecimiento, esqueléticos y cardíacos. La terapia génica *in vivo* basada en la administración de vectores adenoasociados (AAV) que codifiquen la proteína GALNS podría superar las limitaciones de la ERT, ya que posibilitaría la expresión continua de *Galns* a largo plazo.

Por tanto, *el objetivo general* de la presente tesis doctoral fue **desarrollar una terapia génica eficaz para el tratamiento de Morquio A**. Este objetivo principal se subdividió en dos *objetivos específicos*:

1. **Generar una rata modelo de la MPS IVA con deficiencia de la enzima GALNS, utilizando el sistema de CRISPR/Cas9 para introducir en el genoma de la rata la mutación missense más frecuente en pacientes de Morquio A.**
2. **Desarrollar una estrategia de terapia génica *in vivo* mediada por AAVs para el tratamiento de la MPS IVA.** Este objetivo se subdividió en los siguientes:
 - 2.1. *Determinar la biodistribución y la eficiencia de transducción del vector AAV9-GFP en el sistema esquelético y en otros órganos y tejidos afectados en pacientes de Morquio A.*
 - 2.2. *Evaluar el efecto terapéutico de la administración intravenosa de un vector AAV9 codificante para la proteína GALNS (AAV9-Galns) en la rata modelo de la MPS IVA.*

IV. Resultados

***Parte 1. Generación y caracterización de
una rata modelo de la MPS IVA***

1. GENERACIÓN DE UNA RATA *KNOCK-IN* MODELO DE LA MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA (MPS IVA)

1.1. Estrategia de generación de una nueva rata modelo de la MPS IVA mediante edición genética con la tecnología de CRISPR/Cas9

Dada la necesidad de un modelo animal que mimetice las principales alteraciones observadas en los pacientes de Morquio A, se generó un modelo de rata MPS IVA mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Para ello, se introdujo una mutación en el gen *Galns*, equivalente a la mutación humana más frecuente. En humanos se trata de la mutación *missense* c.1156C>T, en la que se substituye una citosina por una timina en la posición 1156. Este cambio de base genera un cambio de aminoácido (aa) en la superficie de la enzima GALNS, en el que la arginina (Arg) 386 se substituye por una cisteína (Cys), alterando así la estructura terciaria de la proteína. Esta mutación genera una ausencia total de actividad GALNS en pacientes de Morquio A y, por ello, está asociada a un fenotipo severo de la enfermedad (Sukegawa 2000; Shunji Tomatsu, Montaña, et al. 2005).

Con el fin de generar en la rata la mutación equivalente a la humana, se alineó la secuencia proteica de la GALNS humana con la secuencia de la proteína GALNS de *Rattus norvegicus* con el fin de identificar la posición de la Arg386 humana en la proteína de rata. Así, se encontró que el aminoácido Arg equivalente está situado en la posición 388 de la proteína de rata, por lo tanto, la mutación *missense* en la rata debía de generar el cambio de aa Arg388Cys. En la secuencia codificante de la GALNS humana, el cambio de un único nucleótido C>T se sitúa en la posición 1156. La citosina equivalente se identificó en la posición 1162 de la secuencia codificante de la GALNS de rata, ubicada también en el exón 11 del gen. Por lo tanto, la mutación *missense* que se tenía que introducir en el genoma de la rata era c.1162C>T.

Para llevar a cabo la edición genética del gen *Galns* de rata, se diseñaron RNAs guía (gRNA) dirigidos al exón 11 del gen *Galns* con el objetivo de inducir la rotura de doble cadena cerca de la posición 1162 (Figura 17A). El gRNA se diseñó para reconocer la secuencia complementaria del DNA genómico y, por lo tanto, permitió una rotura de doble cadena específica, a través del reclutamiento de Cas9 en esa región gracias al reconocimiento de la secuencia PAM. Estas roturas de doble cadena permiten la inactivación de genes, mediante la reparación por uniones de extremos no homólogos (NHEJ; *Non homologous end joining*), lo cual generaría un *knock-out* (KO), o la introducción de mutaciones puntuales mediante reparación dirigida por homología

(HDR; *Homology directed repair*) con un DNA donante portador de una mutación, lo cual generaría un *Knock-in* (KI).

Con el fin de generar una rata KI portadora de la mutación c.1162C>T, se diseñó una secuencia de DNA donante de una sola hebra, que incluía dos brazos de homología, la mutación c.1162C>T y, además, una diana de restricción para la enzima *MbolI*, introducida para poder identificar los animales portadores de la mutación. El gRNA específico, junto con el DNA donante y el mRNA de Cas9 se microinyectaron conjuntamente en embriones de rata Sprague Dawley de una célula, tal y como se indica en Material y Métodos.

La microinyección en embriones de rata, y la posterior transferencia a hembras receptoras, dio lugar al nacimiento de 246 ratas. En esta primera generación de ratas, también conocida como fundadoras o F0, se observaron mediante análisis por PCR, y digestión con *MbolI*, patrones de bandas distintos (Figura 17B). Esto confirmó la reparación por HDR y, por lo tanto, la introducción del DNA donador en los animales KI (Figura 17B). El análisis por secuenciación de Sanger de los amplicones de PCR confirmó la introducción de la mutación C>T y de la diana de restricción *MbolI* en el gen *Galns* de rata (Figura 17C). También se obtuvieron ratas KO debido a la reparación por NHEJ que, a diferencia de las ratas KI, presentaban mutaciones de desplazamiento del marco de lectura, como se muestra en la Figura 17C. Tras este análisis, se observó que alrededor del 25% (62/246) de las ratas presentaban un alelo KO y del 9% (22/246) presentaban el alelo KI.

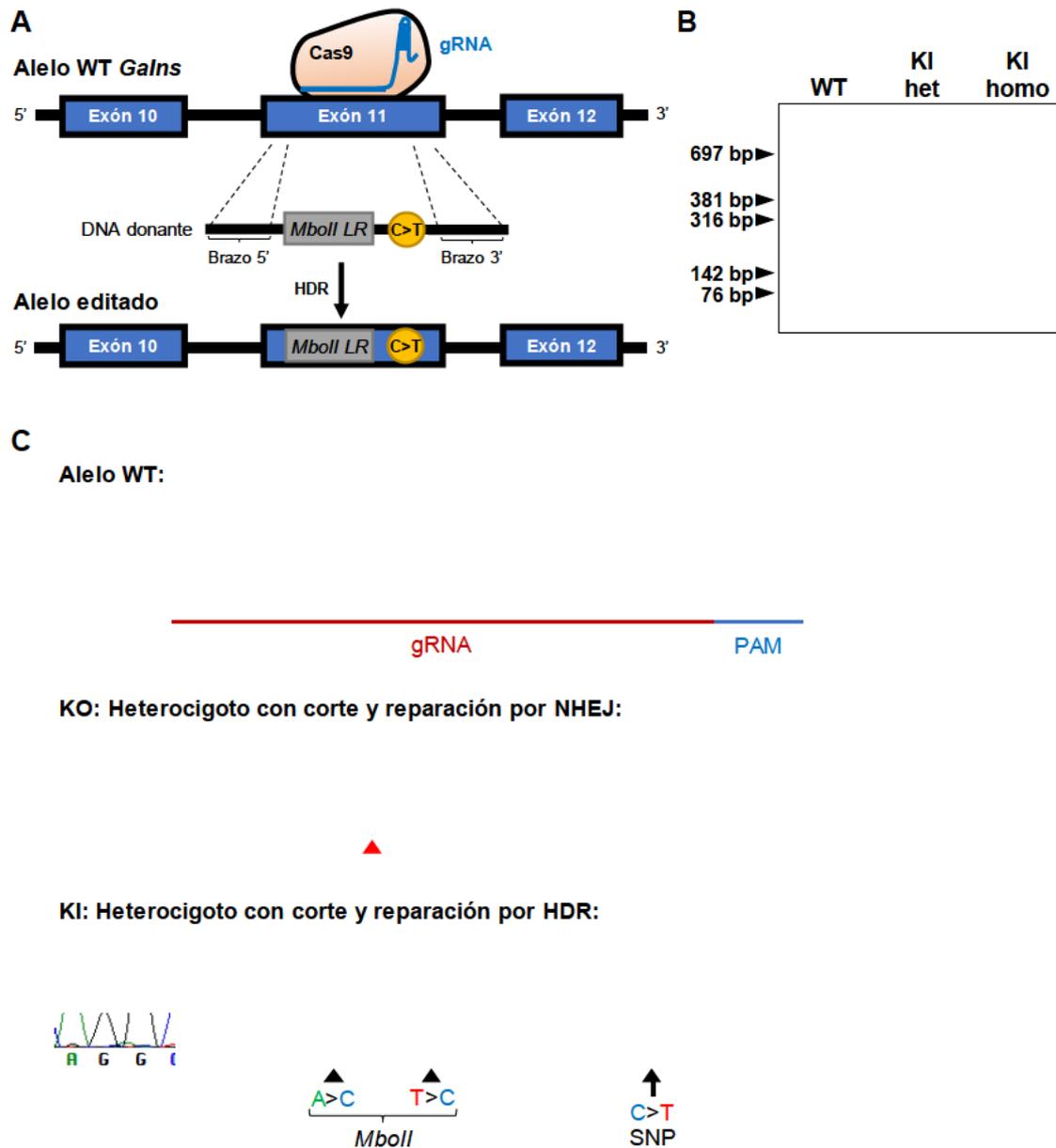


Figura 17. Generación de una rata modelo de MPS IVA utilizando la tecnología CRISPR/Cas9. (A) Representación esquemática de la estrategia CRISPR/Cas9 utilizada para generar ratas *knock-in* en el gen *Galns*. Tras la rotura de doble cadena mediada por la Cas9, se introdujo en el genoma de rata mediante HDR el DNA donante que contenía la mutación C>T y el sitio de restricción *MboII*. **(B)** Imagen representativa de un gel de agarosa que muestra los amplicones de ratas WT (*Galns*^{+/+}), KI heterocigotas (*Galns*^{+/-}) y KI homocigotas (*Galns*^{-/-}) generados por PCR y posterior digestión con *MboII*. La digestión con *MboII* generó 3 fragmentos de 697, 142 y 76 pb en el alelo WT; y 381, 316, 142 y 76 pb en el alelo KI. **(C)** La secuenciación de Sanger de los amplicones de PCR confirmó la introducción de la mutación C>T (flecha negra) y el sitio de restricción *MboII* (cabezas de flecha negras) en alelos KI, mientras que los alelos KO mostraron picos superpuestos debido a mutaciones de desplazamiento del marco de lectura (la cabeza de flecha roja indica el inicio de los picos superpuestos). KO: *Knock-Out*; KI: *Knock-In*; het: heterocigoto; homo: homocigoto; SNP: Polimorfismo de Nucleótido Único; PAM: Motivo Adyacente de Protoespaciador; *MboII* LR: Lugar de restricción de *MboII*.

Los amplicones obtenidos tras la secuenciación por Sanger se analizaron también utilizando el software TIDE (*Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition*). Este software permitió diferenciar de manera rápida y eficiente los animales KI de los KO tras la edición genómica a partir de un alineamiento con una secuencia control del exón 11 del gen *Galns*, también obtenida por secuenciación de Sanger (Figura 18).

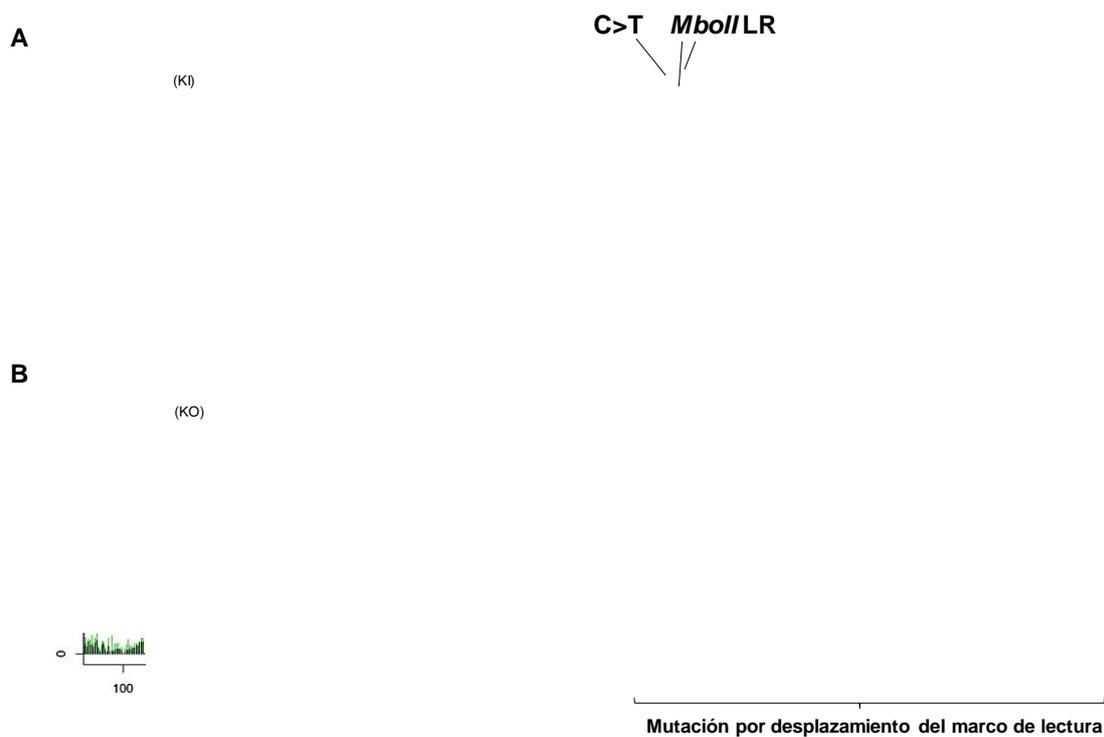


Figura 18. Análisis bioinformático de la edición génica mediante TIDE. (A) Las ratas KI mostraron tres puntos distintos (verde claro) en comparación a la secuencia control WT (verde oscuro), uno correspondiente a la mutación de interés (C>T) y dos a la nueva diana de restricción para *MbolI* (*MbolI* LR). **(B)** Las ratas KO mostraron múltiples puntos distintos (verde claro) en comparación a la secuencia control WT (verde oscuro), correspondientes a una mutación por cambio de marco de lectura que alteraba toda la secuencia aproximadamente a partir del punto de corte de la Cas9 (línea azul discontinua).

1.2. Secuenciación de alelos del gen *Galns*

La secuenciación de Sanger permitió identificar qué ratas habían introducido la mutación C>T en su genoma por HDR con el DNA donante (ratas KI) y en cuáles se había reparado por NHEJ, generando indels en la secuencia (ratas KO). El 8% de las ratas F0 analizadas presentaron un genotipo KI/KO, es decir, presentaban la mutación C>T (KI) y un desplazamiento del marco de lectura (KO) en el genoma. El inconveniente de la secuenciación de Sanger es que amplificaba las dos copias del gen *Galns*, de manera que no permitía estudiar los alelos de *Galns* por separado en un mismo animal. Con el fin de demostrar que la mutación C>T deseada se había insertado en una sola

copia del gen, sin alterar ningún otro nucleótido de la secuencia, se realizó la secuenciación de los alelos *Galns* por separado.

El diseño experimental para secuenciar los alelos *Galns* de 6 ratas de manera independiente se muestra en la Figura 19. El objetivo fue introducir en un plásmido p123T un fragmento del amplicón *Galns*, obtenido tras la amplificación por PCR utilizando los *primers Fw* y *Rv* del genotipado (ver Material y Métodos). En este amplicón se encontraba la mutación C>T, en las ratas KI, y/o la mutación de cambio del marco de lectura, en los animales KO. Para analizar cada alelo de manera independiente, se separaron las copias del gen *Galns* mediante clonación en un plásmido p123T, ya que en cada plásmido sólo podía ligar una copia de *Galns*. Posteriormente, se transformaron dichos plásmidos en bacterias *XL2Blue* para amplificar el DNA plasmídico. Se seleccionaron 6 colonias y se aisló el DNA plasmídico de cada colonia, el cual contenía sólo una copia del gen *Galns*. Se identificó la correcta inserción del amplicón mediante una digestión con *DraI*, una diana endógena localizada en el gen *Galns*. Finalmente, se secuenciaron por Sanger los plásmidos con *primers T3* y *T7* que se encontraban en el plásmido p123T flanqueando el amplicón en 5' y 3', respectivamente.

Los resultados de la secuenciación de alelos de las 6 ratas seleccionadas se muestran en la Tabla 7. De esta manera, se pudo analizar cada alelo *Galns* por separado y detectar aquellos alelos que habían introducido correctamente tanto la mutación C>T como la diana de restricción para *MboII* (ratas KI) de aquellos con indels que generaban mutaciones de desplazamiento del marco de lectura (ratas KO). Esto permitió seleccionar las ratas KI fundadoras (F0) para formar a continuación las colonias de ratas modelo de MPS IVA.

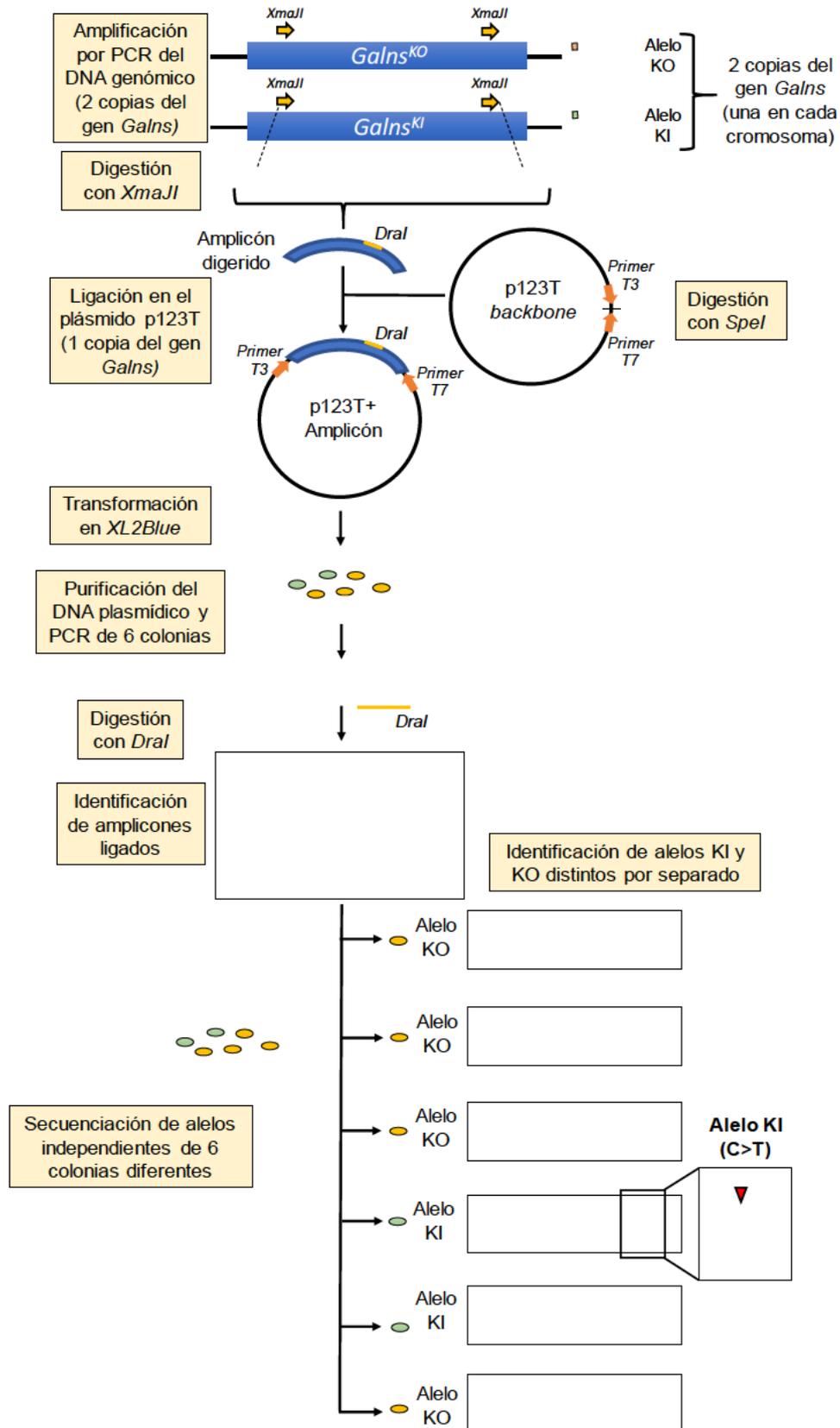


Figura 19. Diseño de secuenciación de alelos *Galns* por separado. El esquema muestra los pasos seguidos para secuenciar los alelos de *Galns* por separado e identificar así las distintas mutaciones en las distintas copias de cada cromosoma. Se separaron las 2 copias de *Galns* mediante clonación en un plásmido p123T y transformación bacteriana. Se identificaron los insertos ligados en el plásmido mediante digestión con *DraI* y se secuenciaron mediante secuenciación de Sanger con los primers T3 y T7 que flanqueaban el inserto.

Tabla 7: Resultados del análisis de secuenciación de alelos

Rata	Colonia	Secuenciación de alelos	Rata	Colonia	Secuenciación de alelos
Rata1 (KI)	1.1	KI	Rata4 (KI)	4.1	KI
	1.2	no amp		4.2	KI
	1.3	no amp		4.3	KI
	1.4	KI		4.4	KI
	1.5	KI		4.5	KI
	1.6	KI		4.6	KI
Rata2 (KI/KO)	2.1	KO	Rata5 (KI/KO)	5.1	KO
	2.2	KI		5.2	KI
	2.3	no amp		5.3	KO
	2.4	KO		5.4	KI
	2.5	KO		5.5	KI
	2.6	KO		5.6	KO
Rata3 (KI/KO)	3.1	KO	Rata6 (KI/KO)	6.1	KI+KO
	3.2	KO		6.2	KI+KO
	3.3	KO		6.3	KI+KO
	3.4	KI		6.4	KI+KO
	3.5	KI		6.5	KI+KO
	3.6	KO		6.6	KI+KO

Las dos copias del gen *Galns* de 6 ratas, de genotipo KI o KI/KO, se separaron mediante clonación en un plásmido. Se secuenciaron por Sanger 6 colonias obtenidas tras la transformación de dicho plásmido. Los resultados de la secuenciación de alelos muestran la presencia de alelos KI (*Knock-in*), alelos KO (*Knock-out*) o "no amp" si no amplificó. Todas las ratas analizadas, exceptuando la rata n°6, mostraron los alelos KI y KO en diferentes copias del gen *Galns*.

1.3. Obtención de la rata modelo de MPS IVA tras retrocruces selectivos para la segregación cromosómica de *off-targets*

Las ratas homocigotas *Knock-in Galns*^{-/-} de la F0 no mostraron niveles detectables de actividad GALNS circulante en comparación con las ratas WT (Figura 20A), lo que confirmó que la mutación C>T introducida conducía a una completa deficiencia de la actividad enzimática GALNS.

Estudios recientes han demostrado que el sistema CRISPR/Cas9 puede ocasionar mutaciones no deseadas (*off-target*) (Tsai et al. 2017; Wilson et al. 2019). Para conseguir reducir al máximo estos eventos *off-target*, se generaron dos líneas de ratas KI (L1 y L2) a partir de progenitores independientes de la F0 y se realizaron retrocruces selectivos durante 3 generaciones para segregar los posibles *off-targets* generados por el sistema CRISPR/Cas9. La actividad GALNS se midió en las ratas obtenidas en las tres generaciones (F1, F2 y F3), sin observar diferencias entre líneas, dado que todas ratas *Galns*^{+/-} heterocigotas obtuvieron valores de actividad GALNS aproximadamente del 50% respecto al WT (Figura 20B). Finalmente, se cruzaron ratas heterocigotas de la tercera generación (F3) para obtener ratas KI *Galns*^{-/-} homocigotas,

denominadas ratas MPS IVA, en la cuarta generación (F4). Las ratas MPS IVA de la L1 y L2 no presentaron niveles detectables de actividad GALNS circulante a 1 mes de edad (Figura 20C). Esta falta de actividad de GALNS era paralela a la acumulación patológica de KS en el hígado de ambas líneas (Figura 20D). Además, a los 2 meses de edad, se detectó una reducción de la longitud naso-anal (Figura 20E) y del peso corporal (Figura 20F) en las ratas MPS IVA de ambas líneas, lo que confirmaba que el fenotipo MPS IVA era similar en las dos líneas de ratas KI. Dado que ambas líneas presentaron fenotipos muy similares, se seleccionó la línea de ratas L2 para los estudios siguientes.

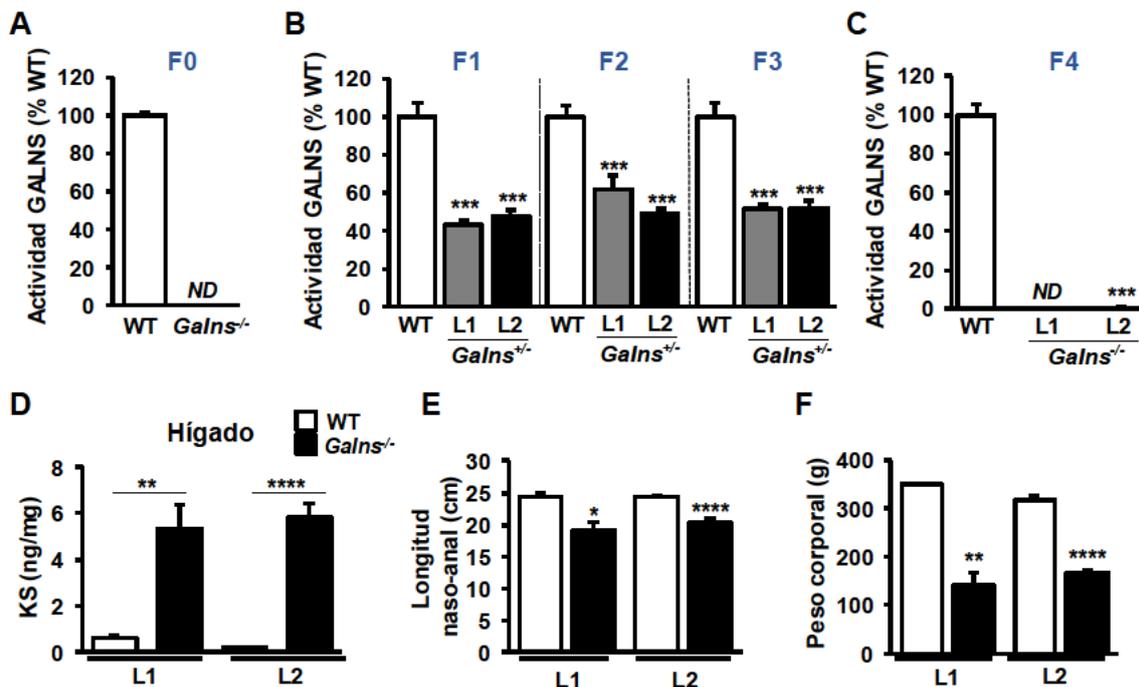


Figura 20. Caracterización de dos líneas independientes de ratas KI para el gen *Galns*. (A) Determinación de la actividad GALNS en muestras de suero de ratas WT y KI *Galns*^{-/-} de la generación F0 a 1 mes de edad. La actividad GALNS fue prácticamente indetectable en los animales *Galns*^{-/-}. (WT: n=8; *Galns*^{-/-}: n=2). (B) Actividad GALNS circulante de 3 generaciones de ratas diferentes (F1, F2 y F3) a 1 mes de edad procedentes de dos líneas de KI (L1 y L2) heterocigotas (*Galns*^{+/-}). Tanto la L1 como la L2 mostraron aproximadamente el 50% de la actividad WT (WT: n=4-7; *Galns*^{+/-} (L1): n=4-8; *Galns*^{+/-} (L2): n=3-11). (C) Medición de la actividad GALNS circulante de ratas WT y KI homocigotas (*Galns*^{-/-}) de la generación F4 a 1 mes de edad. La actividad GALNS fue prácticamente indetectable en las ratas KI. (WT: n=15; *Galns*^{-/-} (L1): n=4; (L2): n=8). (D) Cuantificación del KS hepático por LC-MS/MS en ratas WT y MPS IVA de 3 meses de edad de las líneas L1 y L2 de la F4. n=3-5 animales por grupo. (E) La longitud naso-anal de las ratas WT y KI *Galns*^{-/-} de la L1 y de la L2 a los 2 meses de edad fue significativamente más baja en los animales KI. n=3-5 animales por grupo. (F) Peso corporal de ratas WT y MPS IVA de las líneas L1 y L2 a los 2 meses de edad. Los animales KI *Galns*^{-/-} presentaron una disminución significativa en el peso corporal a esta edad temprana en comparación con las ratas WT. (WT (L1): n=2; WT (L2): n=35; *Galns*^{-/-} (L1): n=3; *Galns*^{-/-} (L2): n=35 animales por grupo). Los resultados se muestran como media ± SEM. **P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001 y *****P*<0,0001 vs WT. ND: no detectable.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA RATA MODELO DE MPS IVA

2.1. Análisis de la actividad GALNS y la acumulación de KS en las ratas MPS IVA

Tras demostrar la ausencia de actividad GALNS circulante en las ratas MPS IVA (Figura 20C), se procedió a analizar la actividad GALNS en múltiples órganos de dichas ratas. Como se esperaba, las ratas MPS IVA presentaron niveles prácticamente indetectables de actividad GALNS en todos los tejidos analizados, como el hígado, el corazón, el pulmón y el cerebro (Figura 21A). La falta de actividad enzimática GALNS resultó en un aumento progresivo en el contenido de KS en suero (Figura 21B) e hígado (Figura 21C).

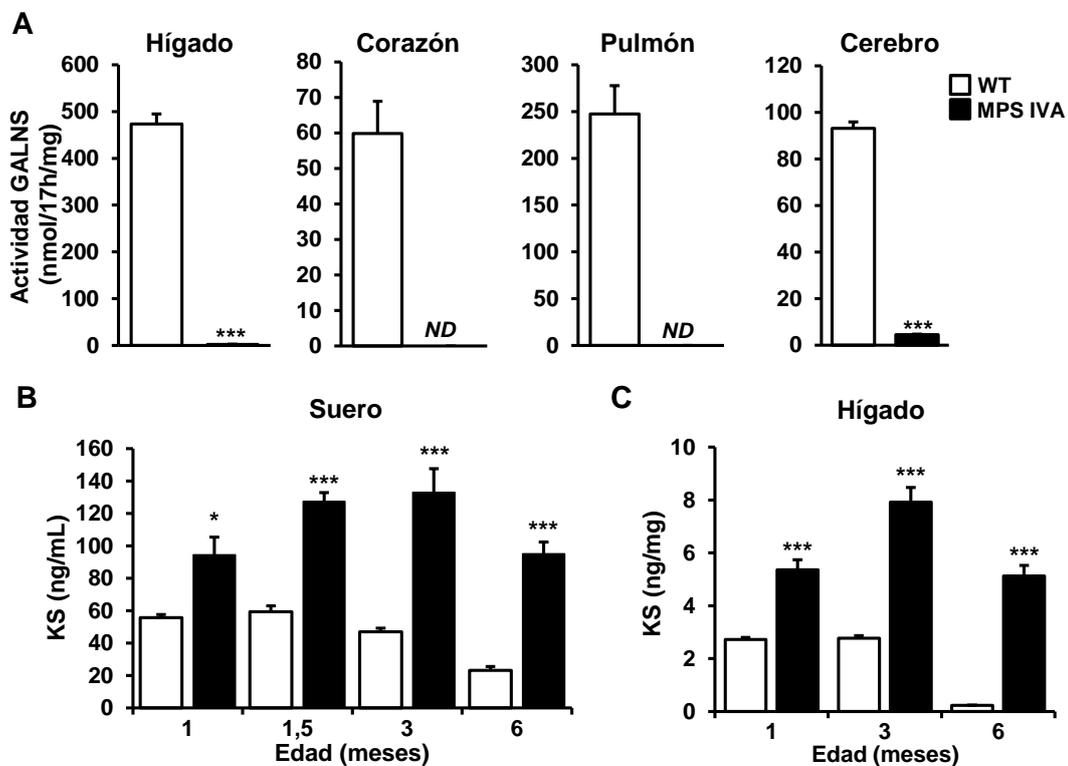


Figura 21. Actividad de GALNS y contenido de KS en ratas MPS IVA. (A) Actividad GALNS en el hígado, corazón, pulmón y cerebro de ratas macho WT y MPS IVA a 1 mes de edad. La actividad GALNS fue prácticamente indetectable en todos los tejidos analizados de ratas MPS IVA. (B, C) Cuantificación de los niveles de KS en suero (B) e hígado (C) de las ratas macho WT y MPS IVA a diferentes edades. Se observó una marcada acumulación de KS en las ratas MPS IVA en todas las edades analizadas. Los resultados se muestran como la media \pm SEM; $n=4-5$ animales por grupo. * $P<0,05$ y *** $P<0,001$ vs WT. ND: no detectable.

La acumulación de KS en el hígado de animales MPS IVA también se confirmó a nivel ultraestructural mediante análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET). Las células de Kupffer de las ratas MPS IVA presentaron numerosas vesículas electrolúcidas en el citoplasma, las cuales podrían corresponder a acúmulos

lisosomales (Figura 22A). En cambio, no se observaron vesículas de almacenamiento en los hepatocitos (Figura 22B).

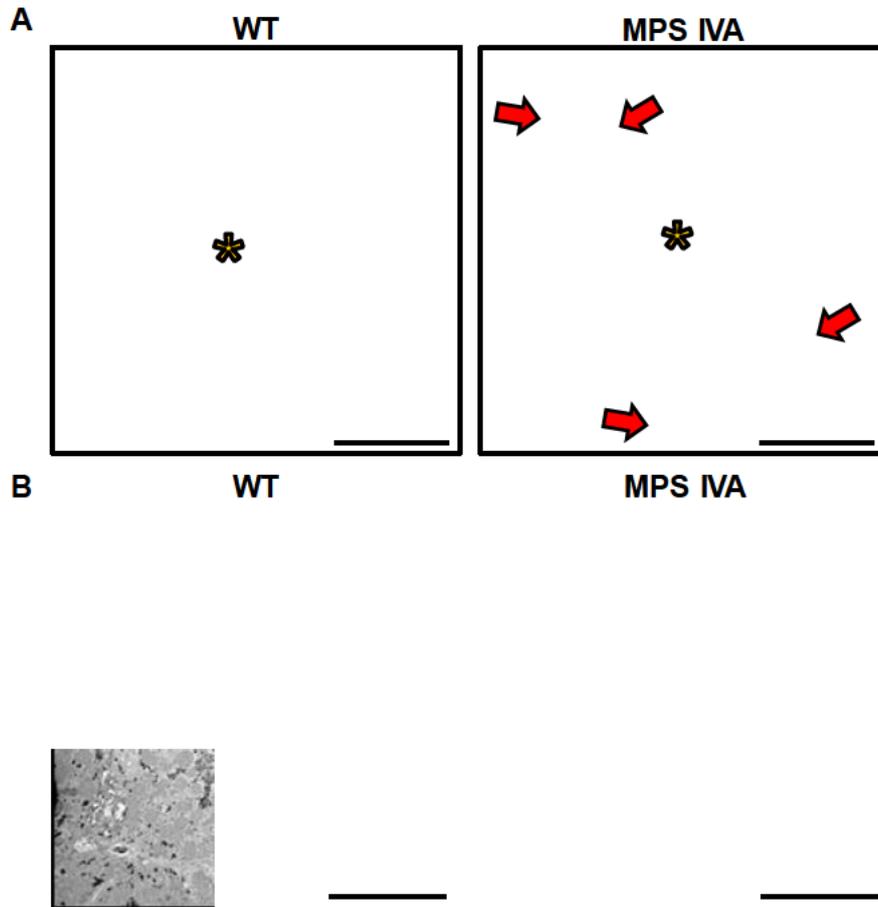


Figura 22. Detección de vesículas de almacenamiento electrolúcido en el hígado de ratas MPS IVA. Análisis ultraestructural del hígado de ratas WT y MPS IVA de 6 meses de edad. (A, B) Imágenes representativas de células de Kupffer (A) y hepatocitos (B). Se detectó un número elevado de vesículas electrolúcidas (flechas rojas) en células de Kupffer (*) del hígado de las ratas MPS IVA. Barra de escala: 5 μ m. n=2-3 animales por grupo.

2.2. Análisis de la patología ósea en ratas MPS IVA

En pacientes de Morquio A, la deficiencia de GALNS genera una acumulación patológica de los glicosaminoglicanos KS y C6S, lo que causa una condrogénesis y/o osificación endocondral anómalas (Shunji Tomatsu et al. 2014; Peracha et al. 2018). Por este motivo, se procedió a evaluar si el déficit de GALNS en las ratas MPS IVA estaba asociado a patología ósea.

El análisis mediante LC-MS/MS del contenido de GAGs evidenció una acumulación significativa de KS, aproximadamente 4 veces mayor, en la epífisis, la placa de crecimiento y la diáfisis del fémur de las ratas MPS IVA a los 6 meses de edad (Tabla 8). Por otro lado, no se detectaron cambios estadísticamente significativos en los

niveles de C6S en ninguna de las regiones del fémur analizadas en las ratas MPS IVA (Tabla 8).

Tabla 8: Cuantificación de la concentración de GAGs en el fémur.

Fémur	GAG analizado	GAG (ng/mg)	
		WT	MPS IVA
Epífisis	KS	1,19 ± 0,23	4,16 ± 0,17
	C4S	5,25 ± 0,42	7,72 ± 0,39
	C6S	1,58 ± 0,45	2,20 ± 0,14
	C4S/C6S	3,85 ± 1,11	3,44 ± 0,69
Placa de crecimiento	KS	1,76 ± 0,34	5,04 ± 0,67
	C4S	339,92 ± 139,11	593,63 ± 116,41
	C6S	18,97 ± 7,69	31,02 ± 25,08
	C4S/C6S	17,53 ± 0,7	13,92 ± 4,24
Diáfisis	KS	0,32 ± 0,07	1,04 ± 0,05
	C4S	2,60 ± 0,93	2,00 ± 0,12
	C6S	0,43 ± 0,03	0,56 ± 0,03
	C4S/C6S	5,93 ± 1,67	3,66 ± 0,48

Los datos que se muestran en la tabla corresponden a la media ± SEM de 3 animales por grupo. KS: Queratán Sulfato, C4S: Condroitín-4-Sulfato, C6S: Condroitín-6-Sulfato.

La acumulación de KS en la placa de crecimiento y en el hueso se tradujo en una reducción de la longitud de la tibia (Figura 23A) y de la longitud naso-anal de las ratas MPS IVA en comparación con los animales WT (Figura 23B). Estos resultados sugerían que la acumulación de KS en la placa de crecimiento podría dar lugar a alteraciones en el crecimiento longitudinal del hueso, generando así alteraciones en la osificación endocondral, tal y como se observa en pacientes de Morquio A.

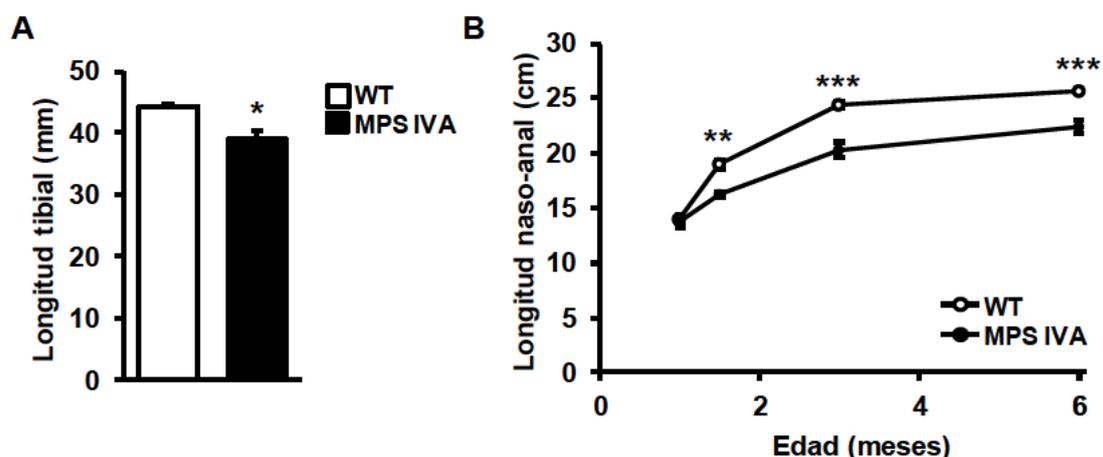


Figura 23. Longitud tibial y naso-anal de ratas MPS IVA. (A) Cuantificación de la longitud tibial de ratas macho WT y MPS IVA de 3 meses de edad mediante análisis por microtomografía computarizada (μ CT). Las tibias de ratas MPS IVA presentaban una longitud estadísticamente inferior a la observada en ratas WT. (B) Análisis de la longitud naso-anal a diferentes edades. Este estudio evidenció que las ratas MPS IVA ya presentaban un tamaño inferior al de las ratas WT a edades muy tempranas y que estas diferencias de tamaño se mantenían en el tiempo. Los resultados se muestran como media ± SEM. n=3-5 animales por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs WT.

Dada la menor longitud de la tibia y del animal, se decidió analizar por microscopía el cartílago de crecimiento de las ratas MPS IVA. Este tipo de cartílago forma la placa de crecimiento y es el principal responsable del crecimiento longitudinal del hueso. Los condrocitos de la placa de crecimiento se disponen en distintas zonas: (1) la zona de reposo o de reserva donde se genera la matriz cartilaginosa, (2) la zona de proliferación donde se estimula el crecimiento longitudinal, (3) la zona de hipertrofia donde los condrocitos degeneran y (4) la zona de calcificación donde se reabsorbe la matriz cartilaginosa para formar el hueso esponjoso cercano a la cavidad medular de la diáfisis (Figura 24).

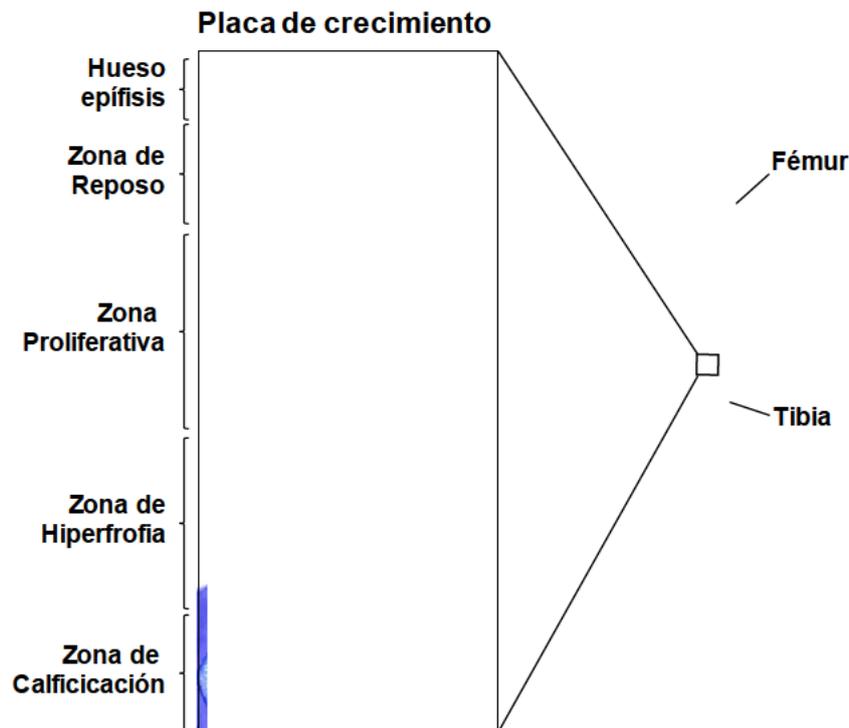


Figura 24. Esquema de las distintas zonas de la placa de crecimiento. La placa de crecimiento se encuentra rodeada por tejido óseo y en su interior los condrocitos se distribuyen en 4 zonas de distinta función. La zona de reposo es la zona superior formada por condrocitos poco activos. Tras ella, la zona proliferativa es donde los condrocitos proliferan formando columnas. La siguiente es la zona de hipertrofia, donde los condrocitos degeneran hasta llegar a la zona de calcificación. Allí, los condrocitos hipertrofos mueren y se calcifican junto con la matriz cartilaginosa para formar el nuevo tejido óseo.

Para analizar las placas de crecimiento tibiales de las ratas MPS IVA a los 6 meses de edad, se realizaron cortes histológicos y se tiñeron con *Safranin Orange* y azul de toluidina. El estudio evidenció una hipertrofia de los condrocitos en la zona de reposo del cartílago de crecimiento en las ratas MPS IVA analizadas (Figura 25A,B). Además, el análisis por MET de las placas de crecimiento demostró la existencia de vacuolas electrolúcidas en el citoplasma de los condrocitos proliferativos en las ratas MPS IVA, mientras que las ratas WT presentaban un citoplasma libre de vacuolas (Figura 25C).

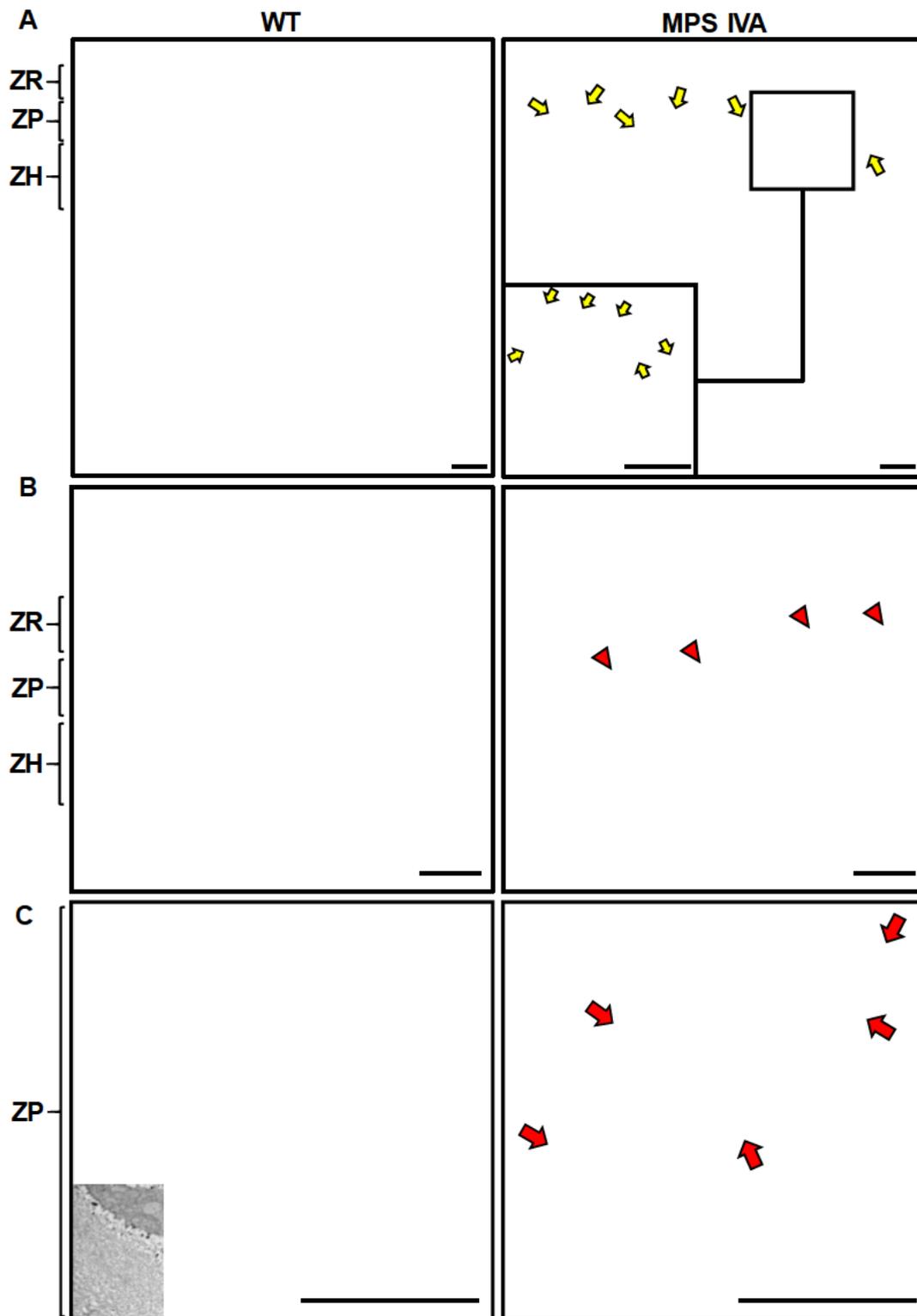


Figura 25. Alteraciones en condrocitos de la placa de crecimiento en las ratas MPS IVA. Análisis de la tibia de ratas WT y MPS IVA a los 6 meses de edad. **(A)** Imágenes representativas de cortes histológicos de placas de crecimiento teñidas con *Safranin Orange*. Las flechas amarillas indican la presencia de condrocitos hipertróficos en la zona de reposo (ZR). Barra de escala: 50 μm . n=3 animales por grupo. **(B)** Imágenes representativas de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina de placas de crecimiento tibial. Las cabezas de flechas rojas muestran condrocitos hipertróficos en la ZR de las ratas MPS IVA. Barra de escala: 50 μm . **(C)** Imágenes representativas del análisis ultraestructural realizado por MET que evidencian la presencia de vesículas de material poco electrodensito (flechas rojas) en los condrocitos proliferativos de las ratas MPS IVA. ZR: Zona de Reposo; ZP: Zona Proliferativa; ZH: Zona Hipertrófica. Barra de escala: 10 μm . n=2-3 animales por grupo.

En conjunto, las ratas MPS IVA presentaron un fenotipo patológico en el cartílago de crecimiento, con acumulación de KS e hipertrofia de los condrocitos, que se tradujo en una reducción en la longitud de la tibia. Estos resultados sugirieron que la acumulación de KS en la placa de crecimiento podría ser la principal causa de las alteraciones óseas observadas en la nueva rata modelo de la MPS IVA, dado que los niveles de C6S no fueron estadísticamente diferentes a los observados en WT.

2.3. Detección de osteoartritis en las articulaciones de las ratas MPS IVA

La enfermedad de Morquio A también se caracteriza por una condrogénesis anómala que conduce a la pérdida temprana del cartílago articular y a complicaciones osteoartriticas secundarias (Shunji Tomatsu et al. 2014; Colmenares-Bonilla and Esquitin-Garduño 2017; Khan et al. 2017). El cartílago articular es un tejido elástico y firme que protege los huesos de las articulaciones, permitiendo que éstos se deslicen unos sobre los otros. Cuando este cartílago se desgasta y empieza a romperse, los huesos de la articulación entran en contacto directo, provocando erosiones en la superficie ósea y dando lugar a la osteoartritis (OA).

Dada la elevada tasa de incidencia de OA en los pacientes de Morquio A, se analizó histológicamente el cartílago articular en las ratas MPS IVA a distintas edades. Las ratas MPS IVA de un mes de edad no mostraron diferencias aparentes en el estado del cartílago articular de la tibia (Figura 26), probablemente debido a que eran jóvenes y el cartílago aún no se había alterado. En cambio, a los 3 meses de edad, ya se empezó a detectar un ligero desgaste de la capa superficial del cartílago articular, con presencia de algunos condrocitos hipertrofiados (Figura 26). Finalmente, cuando se analizó el estado del cartílago articular de las ratas MPS IVA a los 6 meses de edad, se detectó una amplia presencia de condrocitos hipertróficos y vacuolados (Figura 26 y 27A). Además, se observó una mayor erosión y una menor presencia de condrocitos en la capa más externa del cartílago articular (Figura 26).

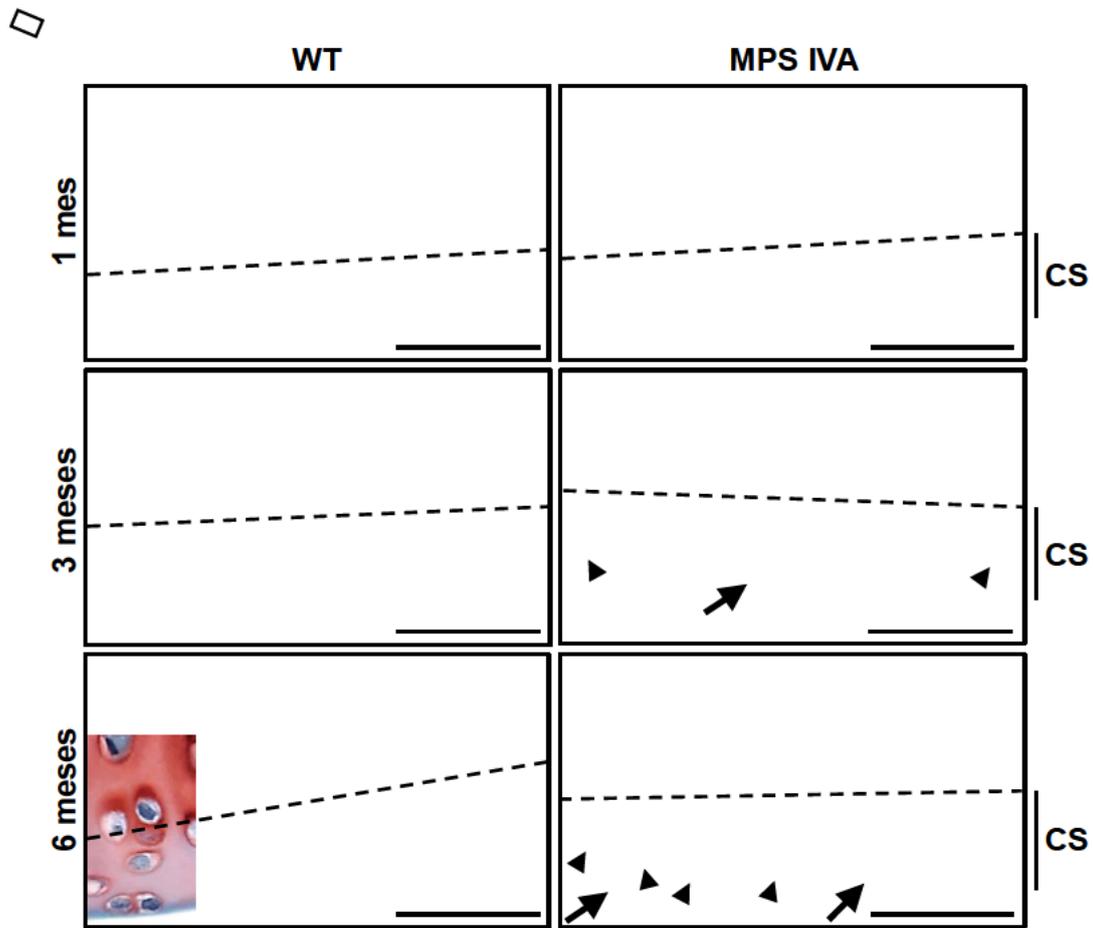


Figura 26. Análisis histológico del cartílago articular de la tibia de ratas MPS IVA. Fotomicrografías representativas de cortes histológicos del cartílago articular tibial teñidos con *Safranin Orange* de ratas macho WT y MPS IVA de 1, 3 y 6 meses de edad. A 1 mes de edad no se detectaron aparentemente diferencias entre ratas WT y MPS IVA. A los 3 meses se detectó una ligera hipertrofia de condrocitos (cabezas de flecha negras) en el cartílago articular y un mayor desgaste (flechas negras) de la CS (delimitada por líneas negras discontinuas) en ratas MPS IVA. A los 6 meses, se detectaron condrocitos hipertroficados (cabezas de flecha negras) en toda la CS del cartílago articular de ratas MPS IVA y un mayor desgaste de la CS (flechas negras). CS: Capa superficial. Barras de escala: 50 μ m.

Dada la hipertrofia de los condrocitos del cartílago articular, se realizó un estudio por MET para analizar la ultraestructura de estas células de la capa más superficial del cartílago articular. A los 6 meses de edad, el estudio ultraestructural evidenció la presencia de múltiples vesículas de material electrolúcido en los condrocitos de las ratas MPS IVA, a diferencia de lo observado en ratas WT (Figura 27B).

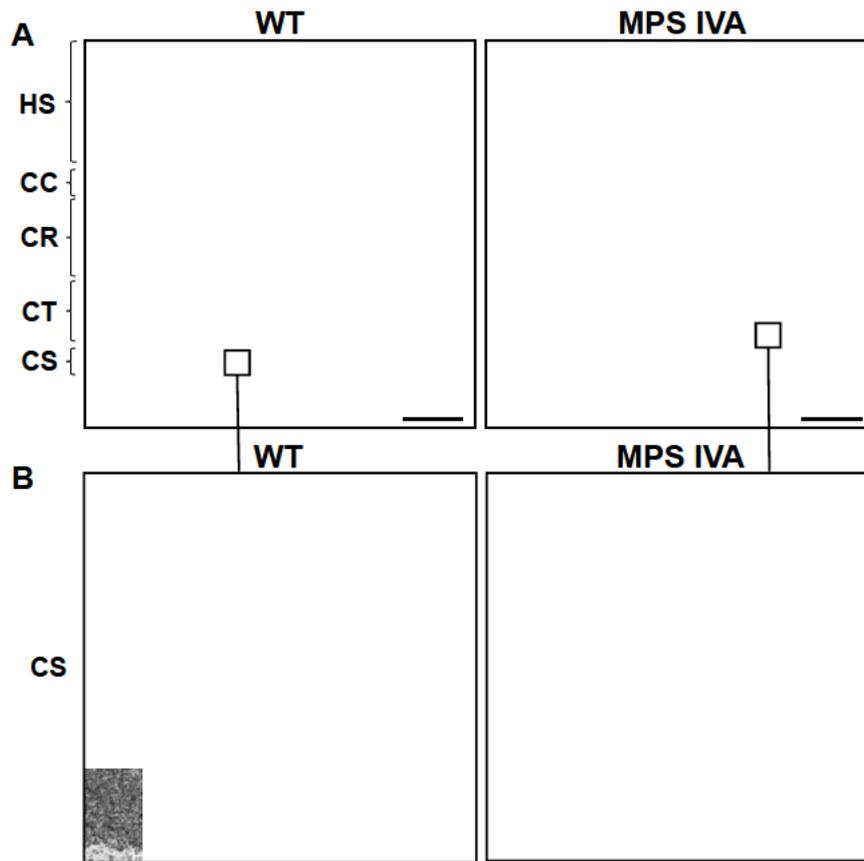


Figura 27. Detección de condrocitos vacuolados en el cartílago articular de la tibia de ratas MPS IVA. Análisis de la tibia de ratas WT y MPS IVA a los 6 meses de edad. **(A)** Fotomicrografías representativas de cortes histológicos del cartílago articular teñidos con Hematoxilina-eosina (HE). El cartílago articular, localizado en la epífisis distal tibial, mostró una hipertrofia de condrocitos generalizada (en la CC, la CR, la CT y la CS) en las ratas MPS IVA. Barras de escala: 50 μ m. n=3 animales por grupo. **(B)** Análisis ultraestructural de los condrocitos de la CS del cartílago articular. Las ratas MPS IVA mostraron una acumulación de material poco electrodenso en los condrocitos de la CS. HS: Hueso subcondral, CC: Capa calcificada, CR: Capa radial, CT: Capa de transición, CS: Capa superficial. Barras de escala: 5 μ m. n=2-3 animales por grupo.

Dadas las alteraciones observadas en el cartílago articular, se analizó a continuación la membrana sinovial de las articulaciones, cuya función es la de secretar el líquido sinovial en la cavidad articular. Este líquido es necesario para nutrir el cartílago articular y disminuir la fricción entre los huesos, lubricando la articulación y acolchándola durante el movimiento. Algunas patologías, como la OA, pueden generar una inflamación de la membrana sinovial que acaba causando sinovitis. En las ratas MPS IVA se observaron dichas alteraciones de la membrana sinovial, mostrando signos típicos de sinovitis como la hiperplasia de las células superficiales de la membrana sinovial (Figura 28).

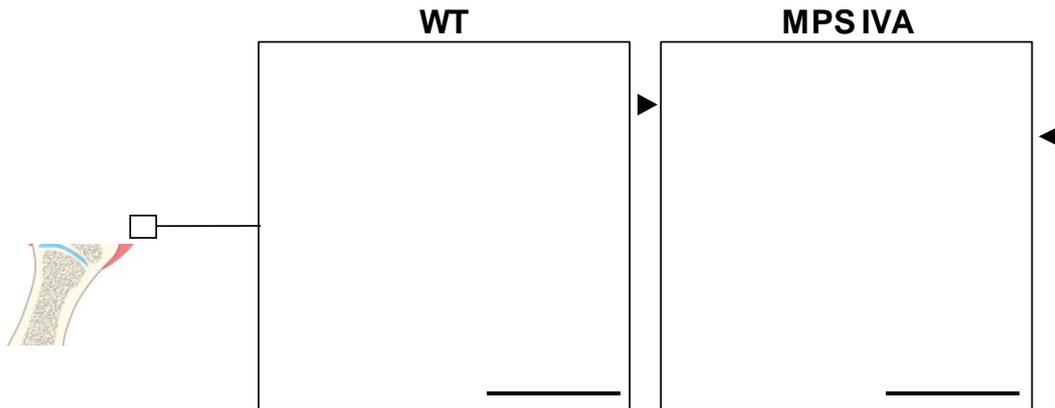


Figura 28. Análisis histológico de la membrana sinovial de ratas MPS IVA. Imágenes representativas de cortes histológicos de la membrana sinovial teñida con HE de ratas WT y MPS IVA de 6 meses de edad. Se detectó una hiperplasia de las células epiteliales de la superficie interna de la membrana sinovial en las ratas MPS IVA (cabezas de flecha negras), correspondiente a una posible inflamación por sinovitis. Barras de escala: 50 μ m. n=3 animales por grupo.

2.4. Evaluación de la patología dental de las ratas MPS IVA

Las anomalías dentales, como la fragilidad dental y la hipoplasia del esmalte, son características frecuentes de los pacientes de Morquio A (S. Tomatsu et al. 2011; De Santana Sarmiento et al. 2015). Los defectos en el esmalte observados en estos pacientes probablemente se deben a la acumulación patológica de KS y C6S en los ameloblastos (Yamakoshi et al. 2002), células cuya función es la de producir el esmalte que refuerza y protege los dientes. Las ratas, a diferencia de los humanos, presentan un pigmento de hierro en el esmalte que da lugar a una coloración anaranjada que se observa claramente en los incisivos. Cuando el esmalte no se produce correctamente, los dientes adquieren una apariencia blanca, correspondiente al color de la dentina, la capa situada bajo el esmalte. Este hecho hace más evidente la hipoplasia del esmalte en los dientes de las ratas.

Dadas las alteraciones dentales características de los pacientes de Morquio A, se analizaron morfológicamente los dientes de las ratas MPS IVA. Este estudio evidenció una pérdida de la pigmentación del esmalte en ratas MPS IVA a los 2 meses de edad, ya que presentaron incisivos blancos (Figura 29A). Otra alteración dental observada en algunas ratas MPS IVA a los 2 meses de edad fue la maloclusión de los incisivos (Figura 29A).

Con el fin de evaluar si la hipoplasia del esmalte observada en las ratas MPS IVA podía estar causada por alteraciones en las células productoras de este esmalte, se analizaron los incisivos las ratas MPS IVA a los 6 meses de edad mediante MET. Este estudio ultraestructural evidenció la presencia de grandes vesículas de

almacenamiento electrolúcido en el citoplasma de los ameloblastos de las ratas MPS IVA (Figura 29B).

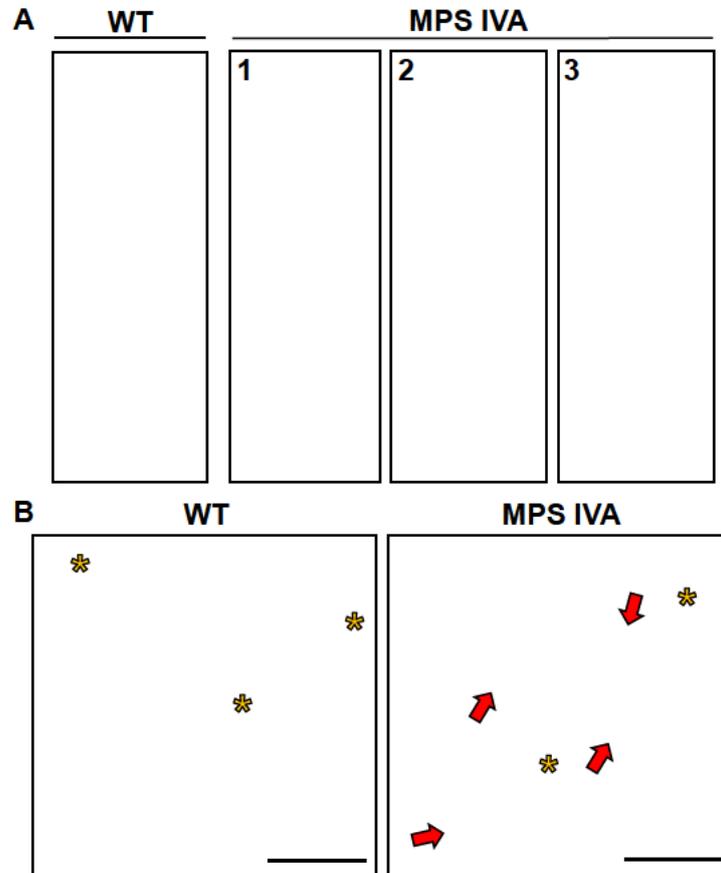


Figura 29. Anomalías dentales en incisivos de ratas MPS IVA. (A) Imágenes representativas de dientes de ratas MPS IVA de 2 meses de edad que muestran signos evidentes de maloclusión (paneles 1 y 3), hipoplasia del esmalte (paneles 2 y 3) y fragilidad dental (paneles 1 y 3). (B) Imágenes representativas del estudio ultraestructural de los ameloblastos en ratas WT y MPS IVA de 6 meses de edad. Se observó un gran número de vacuolas electrolúcidas intracelulares (flechas rojas) en los ameloblastos (*) de ratas MPS IVA. Barras de escala: 5 μ m. n=2 animales por grupo.

2.5. Anomalías en las vías respiratorias de las ratas MPS IVA

Una de las principales complicaciones en los pacientes de Morquio A es la obstrucción traqueal, que aumenta el riesgo de muerte a causa de apneas del sueño o problemas derivados. Esto es debido a que los pacientes presentan una curvatura anómala de la tráquea y una reducción de la luz traqueal, lo que también dificulta la intubación de estos pacientes durante la anestesia (Pizarro et al. 2016; Shunji Tomatsu et al. 2016). Por ello, se analizaron las alteraciones de la tráquea, en primer lugar, mediante la cuantificación del contenido de KS por LC-MS/MS en este tejido cartilaginoso. La cuantificación de KS evidenció una acumulación de este GAG en la tráquea de ratas MPS IVA a los 6 meses de edad (Figura 30A). Además, se observaron

vesículas de almacenamiento en los condrocitos traqueales de las ratas MPS IVA después de la tinción con azul de toluidina de cortes semifinos de tráquea (Figura 30B). Los condrocitos de la tráquea de los animales afectados también mostraron un número mayor de gotas lipídicas pequeñas, en comparación con los condrocitos traqueales de las ratas WT (Figura 30B). Finalmente, el análisis ultraestructural de la tráquea de las ratas MPS IVA de 6 meses de edad permitió observar un gran número de pequeñas vacuolas electrolúcidas y acumulación de lípidos en pequeñas vesículas dentro de los condrocitos traqueales, en comparación con los condrocitos de la tráquea de los animales WT (Figura 30C).

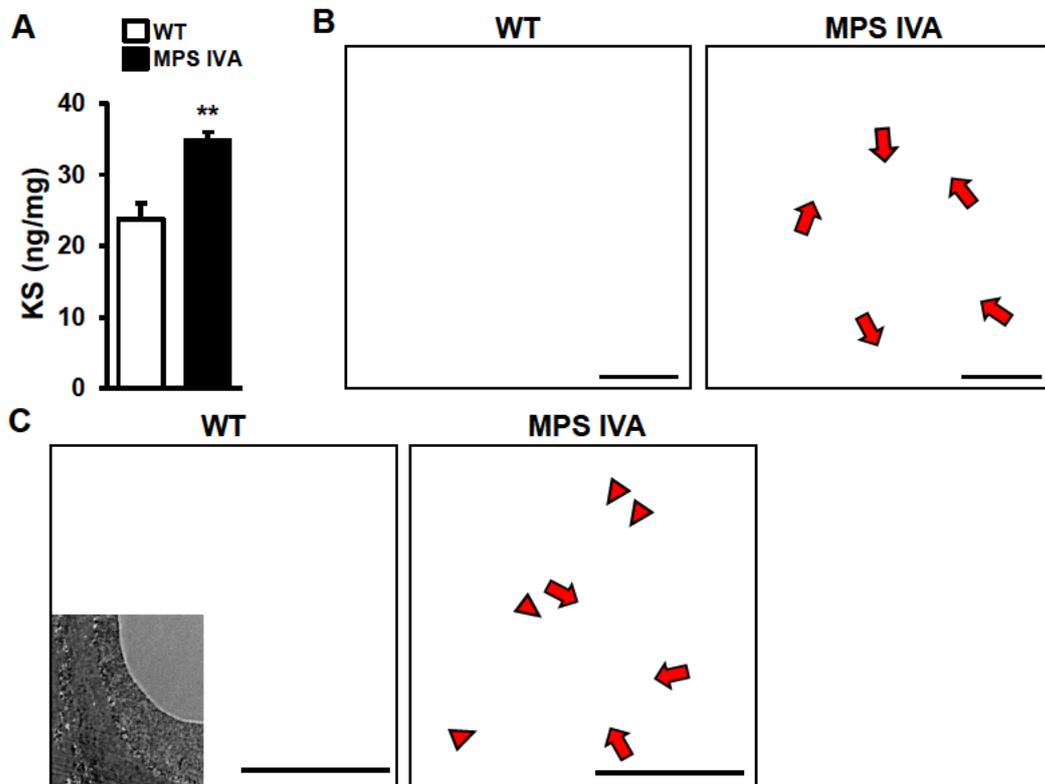


Figura 30. Anomalías detectadas en el cartilago de la tráquea de las ratas MPS IVA. Análisis de la tráquea de ratas WT y MPS IVA a los 6 meses de edad. **(A)** Cuantificación del contenido de KS por LC-MS/MS de la tráquea. Se detectó un incremento significativo de los niveles de KS en las ratas MPS IVA. Los resultados se muestran como media \pm SEM. $n=5$ animales por grupo. $**P<0,01$ vs MPS IVA. **(B)** Fotomicrografías representativas de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina del cartilago hialino de la tráquea. La tráquea de ratas MPS IVA presentó una morfología anómala en comparación con las WT, con condrocitos (flechas rojas) en los que se observaron múltiples vesículas. Barras de escala: 20 μ m. **(C)** Análisis ultraestructural por MET de la tráquea. Se detectó la presencia de material de almacenamiento electrolúcido (puntas de flecha roja) y vesículas lipídicas anormales (flechas rojas) en los condrocitos de la tráquea en ratas MPS IVA. Barras de escala: 10 μ m. $n=2-3$ animales por grupo.

Otra alteración en las vías respiratorias de los pacientes de Morquio A son las infecciones recurrentes, tanto del tracto respiratorio superior como del inferior (El Falaki et al. 2014), probablemente como resultado de las alteraciones en el epitelio respiratorio.

A los 6 meses de edad, las ratas MPS IVA presentaron vesículas de almacenamiento intracelular en las células ciliadas del epitelio respiratorio de la tráquea (Figura 31A). Este hallazgo se confirmó adicionalmente mediante el análisis ultraestructural de este tipo celular, que mostró grandes vacuolas electrolúcidas en las células ciliadas del epitelio respiratorio de las ratas MPS IVA en comparación con las de los animales WT (Figura 31B). A diferencia de las células ciliadas, las células caliciformes o secretoras de mucus, no mostraron acumulación de material electrolúcido (Figura 31B).

Además, el análisis de MET reveló alteraciones en la lámina propia mucosa de la tráquea de las ratas MPS IVA. Esta capa delgada de tejido conectivo forma parte de las membranas mucosas del tracto respiratorio y tiene un importante papel estructural e inmunológico, evitando la entrada de gérmenes en los bronquios. En este tejido, la alteración se observó a nivel de los fibroblastos, los cuales presentaron vesículas de acumulación de material electrolúcido solamente en las ratas MPS IVA (Figura 31B).

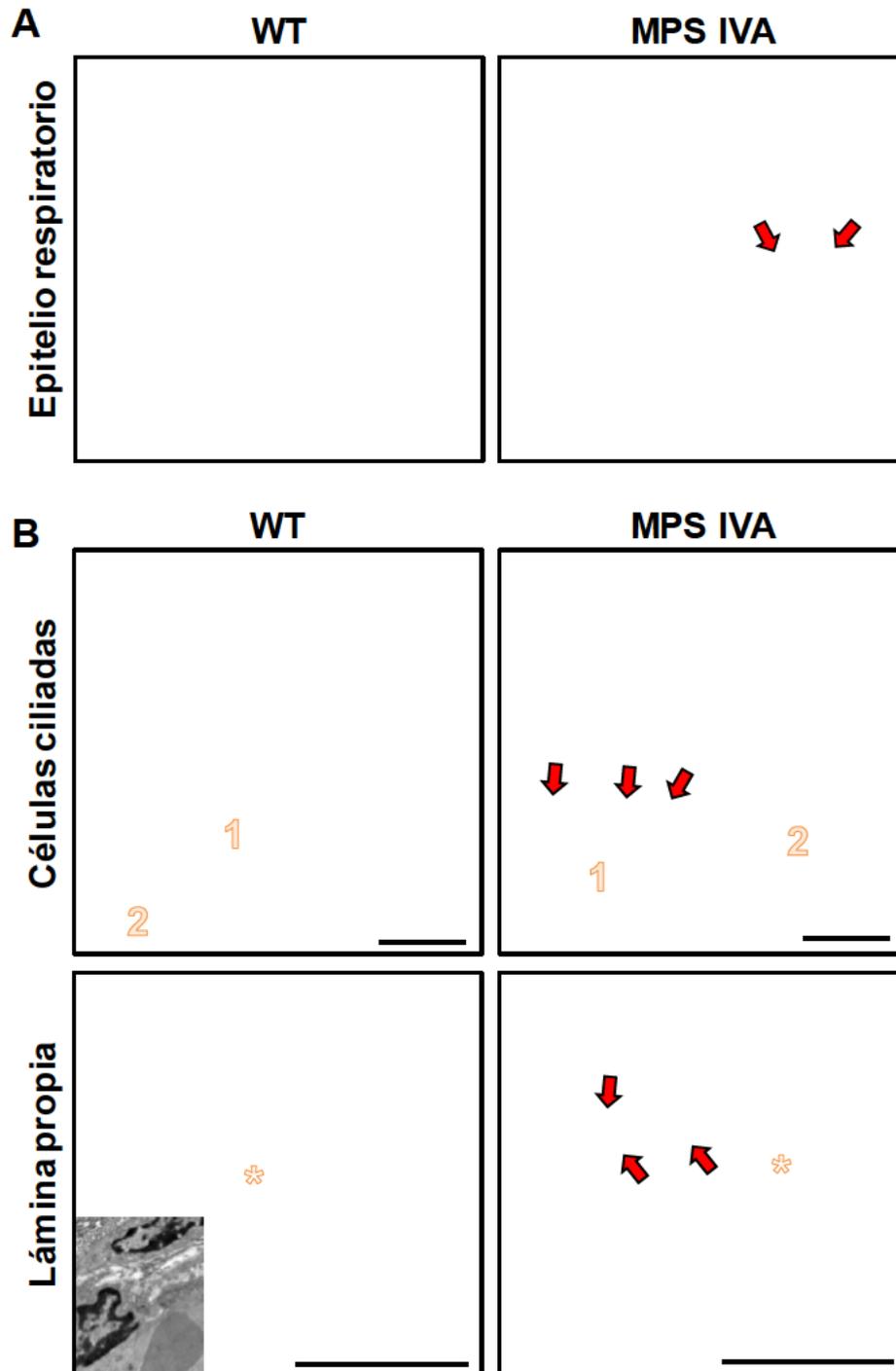


Figura 31. Análisis del epitelio respiratorio de la tráquea de ratas MPS IVA. Análisis de la tráquea de ratas WT y MPS IVA a los 6 meses de edad. **(A)** Fotomicrografías representativas de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina del epitelio respiratorio traqueal. Se observó acumulación intracelular de vesículas de almacenamiento (flechas rojas) en las células ciliadas de los animales MPS IVA. Barras de escala: 10 μm . **(B)** Análisis ultraestructural de las células ciliadas (1) del epitelio respiratorio y fibroblastos (*) de la lámina propia mucosa de la tráquea. Las vesículas electrolúcidas grandes (flechas rojas) se detectaron en ambos tipos celulares de la tráquea de las ratas MPS IVA, pero no en células calciformes (2). Barras de escala: 5 μm . n=2-3 animales por grupo.

2.6. Análisis de las alteraciones cardíacas de las ratas MPS IVA

La deposición de material de almacenamiento dentro de la válvula mitral y las arterias coronarias son las alteraciones responsables de las complicaciones cardiovasculares y, en muchas ocasiones, de la muerte de los pacientes con MPS IVA (Yasuda et al. 2013).

Como se muestra en el análisis ultraestructural por MET, las células musculares lisas de la aorta de ratas MPS IVA de 6 meses de edad presentaron vesículas de almacenamiento electrolúcidas grandes en comparación con los animales WT (Figura 32A). Además, las células de la válvula mitral de las ratas MPS IVA también mostraron vesículas de almacenamiento de material poco electrodensos (Figura 32B). Esta deposición de material en células cardíacas podría generar un problema cardiovascular temprano, alterando el ritmo cardíaco y los patrones diastólicos, tal y como ocurre en los pacientes de MPS IVA.

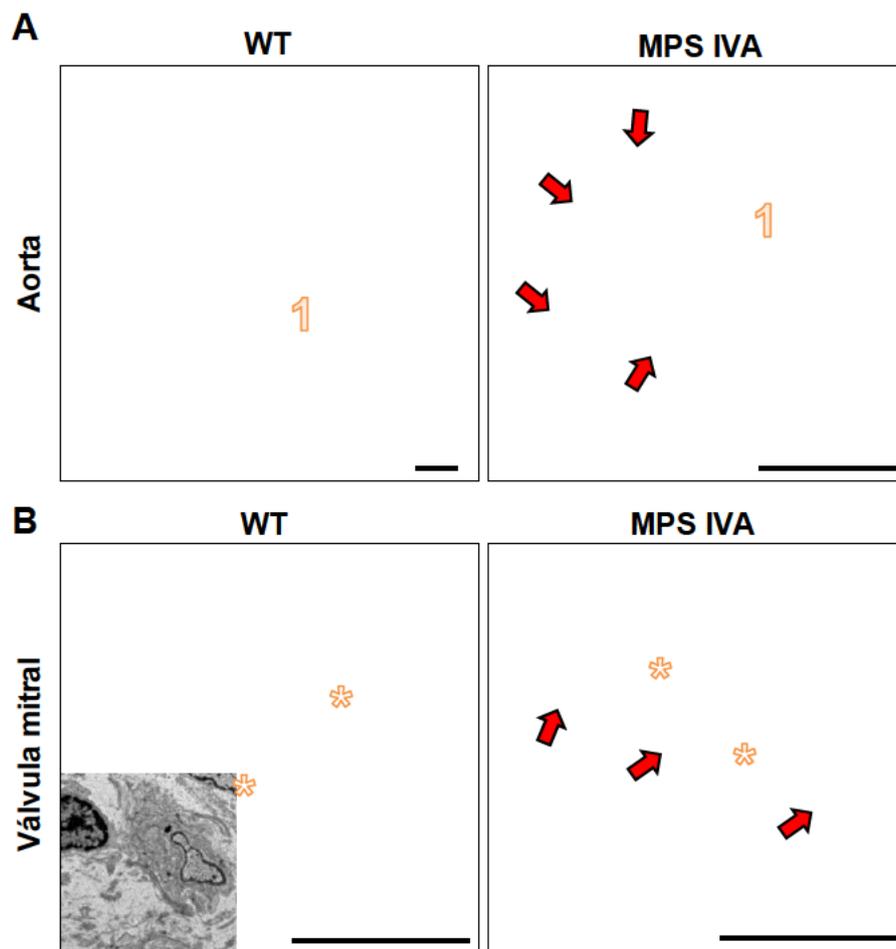


Figura 32. Análisis ultraestructural de la aorta y la válvula mitral de ratas MPS IVA. Análisis del corazón de ratas WT y MPS IVA a los 6 meses de edad. **(A, B)** Análisis de TEM realizado en aorta (A) y válvula mitral (B). Se detectaron múltiples vacuolas electrolúcidas intracelulares (flechas rojas) en células del músculo liso de la aorta (1) y en células de la capa subendocárdica (*) de la válvula mitral de ratas MPS IVA. Barras de escala: 2 μ m (A) y 10 μ m (B). n=2-3 animales por grupo.

2.7. Detección de material de almacenamiento en el cerebro de ratas MPS IVA

En las MPS con afectación en el SNC, como la MPS II o III, existe una gran evidencia de activación de células gliales probablemente debida a la acumulación patológica de GAGs en el SNC (Tamagawa et al. 1985; Kurihara, Kumagai, and Yagishita 1996; Hamano et al. 2008). Aunque la MPS IVA sea considerada una MPS sin afectación en el SNC, el examen neuropatológico postmortem de un paciente con Morquio A reveló la presencia de inflamación en diferentes áreas del cerebro como la corteza cerebral y los ganglios basales (Koto et al. 1978). Uno de los ganglios basales involucrado en las respuestas emocionales es la amígdala, la cuál ha sido el foco de interés de varios grupos de investigación que examinan los comportamientos emocionales y sociales de varios síndromes (Davison et al. 2013). Así pues, alteraciones en estas regiones podrían explicar la mayor incidencia en los pacientes de Morquio A de sufrir alteraciones del comportamiento, como ansiedad y depresión (Davison et al. 2013).

Con el fin de evaluar si las ratas MPS IVA presentaban alteraciones en el SNC, se realizó un análisis en cortes histológicos del cerebro, mediante tinción con azul de toluidina, que reveló la presencia de material acumulado en el isocórtex y la amígdala a los 6 meses de edad (Figura 33A). Estos resultados se confirmaron mediante el análisis ultraestructural por MET del isocórtex y de la amígdala. En ambas áreas del cerebro de ratas MPS IVA, se detectaron vacuolas electrolúcidas que parecían ser lisosomas cargados con GAGs en el citoplasma de células gliales perineuronales, yuxtapuestas a las neuronas de la corteza cerebral (Figura 33B). En cambio, no se observaron lesiones en las neuronas a la edad del análisis (Figura 33B).

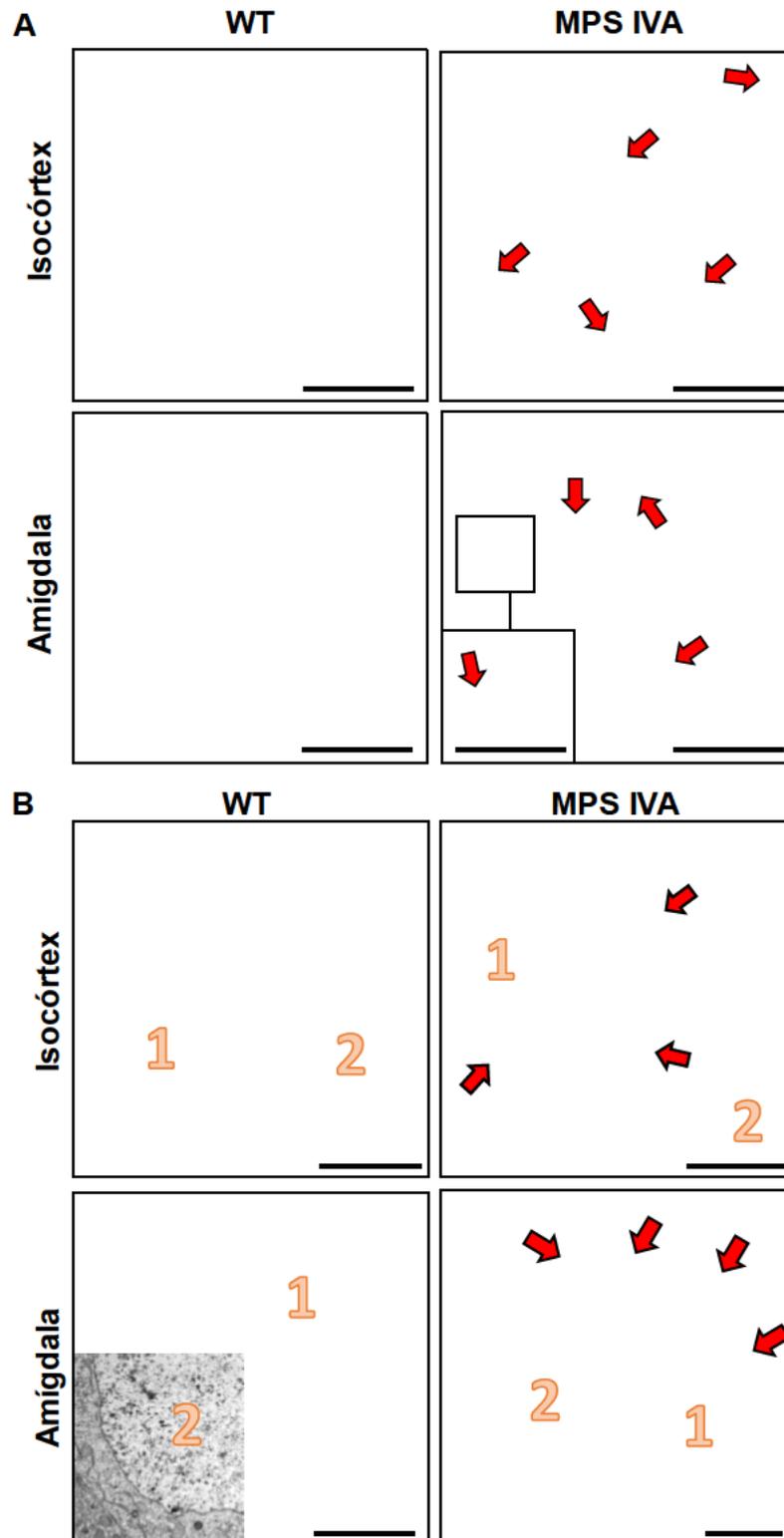


Figura 33. Detección de material acumulado en distintas áreas del cerebro de ratas MPS IVA. Análisis del encéfalo de ratas WT y MPS IVA a los 6 meses de edad. **(A)** Fotomicrografías representativas de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina del isocórtex y de la amígdala. Se detectaron múltiples células con acúmulos (flechas rojas) en ambas zonas del cerebro de ratas MPS IVA. Barras de escala: isocórtex: 20 μ m; amígdala: 50 μ m; inset amígdala: 20 μ m. **(B)** Análisis ultraestructural por MET del isocórtex y de la amígdala. Se detectaron vesículas electrolúcidas (flechas rojas) en células gliales perineuronales (1) asociadas con neuronas (2) del isocórtex y la amígdala en ratas MPS IVA. Barras de escala: 5 μ m. n=2-3 animales por grupo.

En conjunto, la nueva rata modelo de la MPS IVA desarrolló los signos patológicos típicos de la enfermedad, como alteraciones en el tamaño corporal, pérdida temprana de cartílago articular, hipertrofia de condrocitos, alteraciones esqueléticas, hipoplasia del esmalte dental y acumulación de KS en todos los órganos estudiados. Por lo tanto, la rata modelo desarrolló la MPS IVA humana y podría proporcionar una herramienta útil para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para revertir las alteraciones esqueléticas, periféricas y centrales de la MPS IVA.

***Parte 2. Estudio de la biodistribución de vectores
AAV9-GFP en el sistema esquelético tras una
administración intravenosa***

1. ESTUDIO DE LA BIODISTRIBUCIÓN DEL VECTOR ADENOASOCIADO DE SEROTIPO 9 (AAV9) PARA LA TRANSFERENCIA GÉNICA EN LA MPS IVA

1.1. Administración intravenosa del vector AAV9-GFP en ratas

Las ratas MPS IVA desarrollaron la patología esquelética característica de la enfermedad de Morquio A, demostrando ser un buen modelo para el ensayo de nuevas estrategias terapéuticas. Con el objetivo de desarrollar una terapia génica para Morquio A, se analizó previamente si el vector AAV9 administrado por vía intravenosa (IV) era capaz de transducir los diferentes huesos y tejidos afectados en la MPS IVA. Anteriormente, nuestro laboratorio había demostrado en un estudio de biodistribución en ratones que el vector AAV9 es capaz de transducir el hueso con elevada eficiencia (Sánchez 2018). Por ello, se seleccionó este serotipo para estudiar la farmacocinética no clínica en ratas. Estos vectores AAV9 contenían la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP; *Green Fluorescence Protein*) bajo el control del promotor ubicuo CAG (promotor híbrido formado por el potenciador de la transcripción del citomegalovirus, el promotor de la β -actina de pollo y el primer intrón del gen de la β -globina) para permitir la expresión de GFP en todas las células transducidas del organismo.

Una vez generados los vectores AAV9-GFP, se decidió utilizar la vía intravenosa para su administración, dada la amplia distribución que permite esta vía, alcanzando la mayoría de los tejidos periféricos. Este estudio permitió evaluar la biodistribución del vector AAV9-GFP y su capacidad de transducción del hueso y de los principales órganos alterados en Morquio A, como la tráquea o el corazón.

Con este objetivo, se administró el vector AAV9-GFP por vía IV a una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata ($6,67 \times 10^{13}$ vg/kg) a ratas macho WT de 4 semanas de edad. Dos semanas tras la administración del vector AAV9-GFP, se eutanasiaron los animales, junto con ratas no inyectadas de la misma edad, y se diseccionaron y analizaron distintos tejidos clave. En la Figura 34 se presenta un esquema del diseño del estudio.

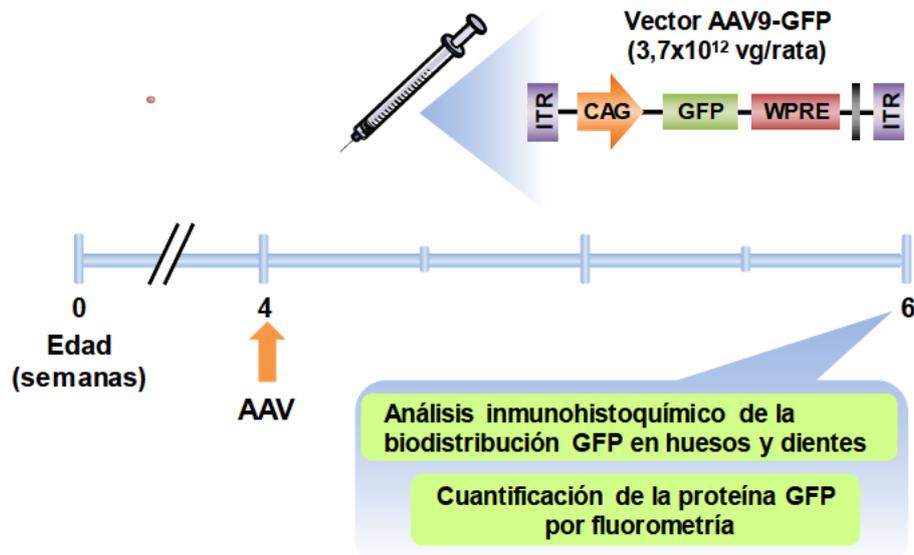


Figura 34. Diseño experimental de la administración intravenosa de los vectores AAV9-GFP a ratas WT macho de 4 semanas de edad a una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata ($6,67 \times 10^{13}$ vg/kg). Se muestra una representación esquemática del genoma del vector AAV9-GFP.

1.2. Biodistribución del vector AAV9-GFP en el tejido óseo

Puesto que las principales alteraciones que sufren los pacientes de Morquio A se observan a nivel del tejido esquelético, se decidió evaluar la capacidad de transducción del vector AAV9-GFP en los huesos de rata. Dos semanas después de la administración IV de dicho vector, se detectó mediante análisis por inmunohistoquímica contra GFP en cortes histológicos de fémur y tibia una elevada y extensa transducción en los huesos de las ratas (Figura 35).

Tanto en el fémur como en la tibia, se observó que la transducción del vector AAV9-GFP tenía lugar principalmente en las áreas circundantes de la placa de crecimiento y en el endostio del hueso compacto y trabecular (Figura 35, recuadros II, IV y V, respectivamente). Además, también se observó una marcada expresión de GFP en las células internas del hueso compacto (Figura 35 recuadro I). Sin embargo, en la placa de crecimiento, al tratarse de un tejido avascular, no se detectó expresión de GFP, evidenciando que el vector no era capaz de alcanzar esta zona. Otros tejidos en los que se observó una elevada transducción por parte del vector AAV9-GFP, fueron la capa superficial del cartílago articular, el menisco y la membrana sinovial (Figura 35, recuadro III). Estos tipos celulares se encuentran en el interior de la cápsula sinovial y se nutren gracias al líquido sinovial filtrado de la sangre (Hara, Urban, and Maroudas 1990; Bennike et al. 2014). La expresión de GFP en estos tipos celulares sugiere que el vector AAV9 podría ser capaz de alcanzar el interior de la cápsula sinovial tras una administración IV.

GFP/DAPI

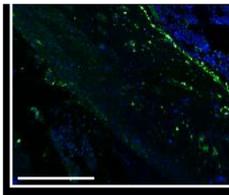


Figura 35. Transducción del fémur y la tibia de ratas tras la administración intravenosa del vector AAV9-GFP. La biodistribución del vector AAV9 se analizó por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra GFP en cortes histológicos del fémur y la tibia de ratas de 6 semanas de edad administradas por vía IV con el vector AAV9-GFP a la dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata a las 4 semanas de edad. La expresión de GFP se detectó en el hueso compacto (I), las áreas adyacentes a la placa de crecimiento (II), la articulación (III), las áreas trabeculares (IV) y el endostio (V) de ratas WT de 6 semanas de edad tras 2 semanas de la administración IV del vector AAV9-GFP. Barras de escala: 2000 μm ; insets, 300 μm . MO: médula ósea; PC: Placa de crecimiento, ME: Músculo esquelético. n=3 animales por grupo.

En conjunto, estos resultados indicaron que el vector AAV9 era capaz de transducir múltiples áreas del fémur y de la tibia, el cartílago articular, el menisco y el epitelio de la membrana sinovial después de una única administración IV del vector.

La zona de la diáfisis más próxima a la placa de crecimiento y el endostio presentaban una elevada transducción con AAV9-GFP. Estas son regiones ricas en osteoblastos (Forriol and Shapiro 2005; Morrison and Scadden 2014), células encargadas de producir y secretar matriz ósea. A medida que estas células secretan esta matriz al medio extracelular, van quedando envueltas por ella y acaban diferenciándose en osteocitos, células maduras que han perdido su capacidad de división (Roca and Castañeda 2005). Los osteocitos son los encargados del mantenimiento óseo de por vida, por lo tanto, su transducción resulta importante en enfermedades óseas ya que permitiría la expresión del transgén en este tejido de forma continuada y a largo plazo. Para evaluar la transducción de los osteoblastos, se realizó un estudio de colocalización mediante el análisis inmunohistoquímico doble contra la proteína marcadora GFP y la Osteocalcina, proteína específica de osteoblastos (Figura 36). Este análisis de colocalización de señal fluorescente demostró que parte de las células transducidas fueron osteoblastos.



Figura 36. Análisis de colocalización GFP-Osteocalcina en tibias de ratas inyectadas con AAV9-GFP. El análisis inmunohistoquímico doble contra GFP y osteocalcina de cortes histológicos de fémur y tibia demostró la capacidad del vector AAV9-GFP para transducir osteoblastos 2 semanas después de la administración intravenosa del vector en ratas WT de 6 semanas de edad. 1: Osteoblastos, 2: Cavidad medular. 3: Tejido óseo.

La eficiencia de transducción del tejido óseo mediada por AAV9-GFP también se analizó mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por GFP en extractos de varios huesos. Dos semanas después de la administración del vector AAV9-GFP, se observaron niveles significativos de fluorescencia de GFP, indicativos de una transducción eficiente en fémur, tibia, costillas, esternón, vértebras y extremidades anteriores (húmero, cúbito y radio) (Figura 37). Estos resultados demostraron que una

única administración intravenosa de vectores AAV9-GFP a ratas era capaz de transducir de forma eficiente los principales huesos del sistema esquelético.

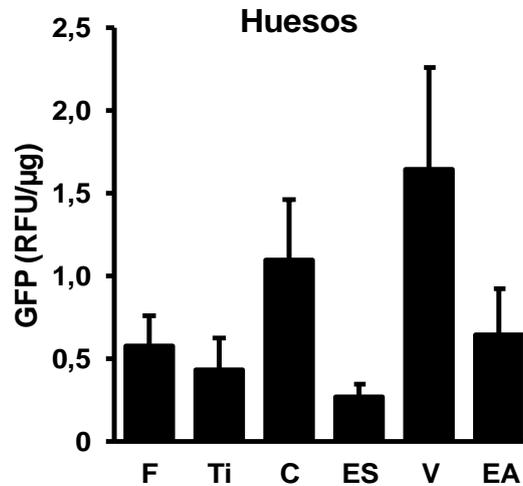


Figura 37. Transducción generalizada de los huesos tras la administración intravenosa del vector AAV9-GFP en ratas. Cuantificación de la fluorescencia de GFP, por ensayo fluorométrico, en huesos dos semanas tras la administración intravenosa de una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata de vectores AAV9-GFP a ratas WT de 4 semanas de edad. F: Fémur, Ti: Tibia, C: Costillas, ES: Esternón, V: Vértabras, EA: Extremidad anterior (húmero, cúbito y radio). Los resultados se muestran como media \pm SEM; n=3 animales por grupo.

1.3. Biodistribución del vector AAV9-GFP en órganos periféricos y encéfalo de ratas

En ratones, la administración IV del vector AAV9 permite la transducción de la mayoría de órganos periféricos (Ruzo, Marcó, et al. 2012; Schuster et al. 2014; Murrey et al. 2014). Para evaluar la eficiencia de transducción del vector AAV9-GFP administrado por vía IV en ratas, se analizó la fluorescencia específica de GFP en los diferentes órganos y tejidos afectados en la enfermedad de Morquio A. Este estudio evidenció la eficiente transducción de dichos órganos, siendo el músculo cardíaco y esquelético el principal tejido transducido por el vector AAV9, seguido de la tráquea, el tejido adiposo y el hígado (Figura 38A).

Dada la capacidad de los vectores AAV9 para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) cuando se administran sistémicamente (Foust et al. 2009; Ruzo, Marcó, et al. 2012; Schuster et al. 2014; Murrey et al. 2014), también se observó que el encéfalo de las ratas administradas con el vector AAV9-GFP se transducía, aunque con una eficiencia menor a la observada en el resto de los tejidos periféricos. La expresión GFP fue prácticamente idéntica en las tres secciones del encéfalo analizadas, demostrando una biodistribución homogénea en todo el encéfalo de las ratas administradas con el vector AAV9-GFP (Figura 38B).

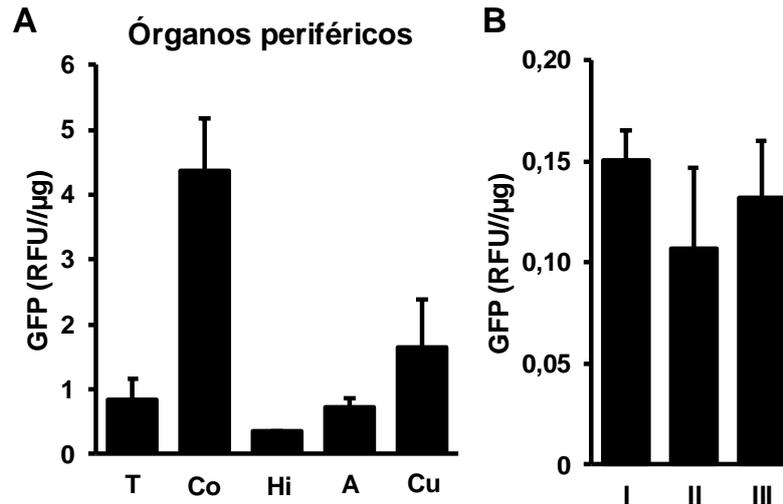


Figura 38. Transducción generalizada de los órganos periféricos y el encéfalo tras la administración intravenosa del vector AAV9-GFP en ratas. (A, B) Cuantificación de la fluorescencia de GFP por ensayo fluorométrico en tejidos periféricos (A) y encéfalo (B), dos semanas tras la administración intravenosa de una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata de vectores AAV9-GFP a ratas de 4 semanas de edad. T: Tráquea, Co: Corazón, Hi: Hígado, A: Tejido Adiposo blanco epididimal, Cu: Cuádriceps. Los resultados se muestran como media \pm SEM; n=3 animales por grupo.

1.4. Biodistribución del vector AAV9-GFP en los dientes de la rata

Dado que las ratas MPS IVA mostraron un fenotipo dental similar al de los pacientes de Morquio A, con hipoplasia del esmalte y maloclusión, se estudió si el vector AAV9 era capaz de transducir los distintos tipos celulares del diente. Dos semanas después de la administración IV del vector AAV9-GFP, se analizó la transducción de los vectores en incisivos y molares mediante análisis inmunohistoquímico contra la proteína GFP en cortes histológicos de los dientes de la rata. Este análisis evidenció una elevada transducción de los odontoblastos y de las áreas circundantes a los ameloblastos tanto en incisivos (Figura 39A) como en molares (Figura 39B) en las ratas administradas con el vector AAV9-GFP. Estos resultados indicaron que los vectores AAV9 administrados sistémicamente pueden transducir eficientemente estas estructuras dentales, afectadas en la enfermedad de Morquio A.

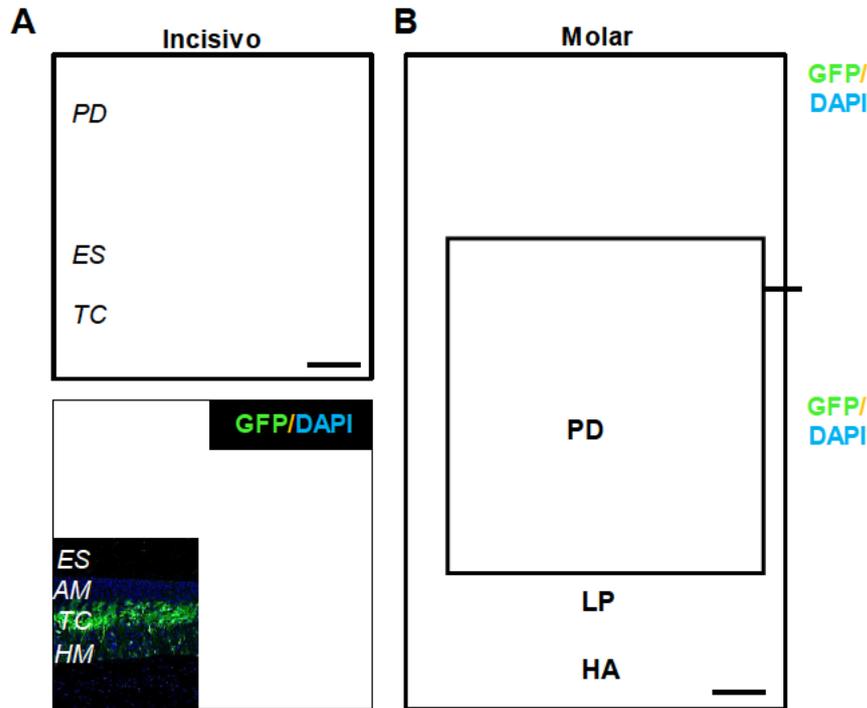


Figura 39. Transducción eficiente de dientes tras la administración IV de vectores AAV9-GFP en ratas. (A, B) Imágenes representativas de la tinción con HE e inmunohistoquímica con GFP de cortes histológicos de incisivos (A) y molares (B) de ratas WT de 6 semanas de edad tras 2 semanas de la administración IV del vector AAV9-GFP. Se observó una transducción eficiente de odontoblastos y tejido conjuntivo de incisivos y molares de ratas tratadas con AAV9-GFP. PD: Pulpa Dental; OD: Odontoblastos; DE: dentina; ES: Esmalte; AM: Ameloblastos; TC: tejido Conjuntivo; HM: Hueso Mandibular; LP: Ligamento Periodontal; HA: Hueso Alveolar. Barras de escala: 100 μ m. n=3 animales por grupo.

En conjunto, el estudio de biodistribución del vector AAV9-GFP demostró la eficacia de dicho vector para transducir eficientemente los tejidos afectados en la enfermedad de Morquio A, incluyendo huesos, dientes, órganos periféricos y encéfalo. Por ello, se decidió utilizar este serotipo para desarrollar una aproximación de terapia génica para el tratamiento de la MPS IVA en ratas modelo de la enfermedad.

***Parte 3. Tratamiento de la rata modelo de la
MPS IVA con el vector AAV9-Galns***

1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR VIRAL ADENOASOCIADO DE SEROTIPO 9 CODIFICANTE PARA LA PROTEÍNA GALNS DE RATA

Dado que las ratas MPS IVA desarrollaron la mayoría de las alteraciones patológicas detectadas en pacientes de Morquio A, en la presente tesis doctoral se estudió la capacidad de contrarrestar dichas alteraciones mediante la terapia génica. Para ello, se desarrolló una aproximación basada en la administración IV de un vector AAV9 que contenía la secuencia codificante del gen *Galns* de rata optimizada bajo el control del promotor ubicuo CAG. Esta estrategia debería permitir la transducción de los principales tejidos alterados en esta enfermedad, incluyendo el sistema esquelético.

Para el diseño y construcción del vector AAV9 terapéutico se seleccionó la secuencia codificante del gen *Galns* de la rata parda (*Rattus norvegicus*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/292073>), la cual fue optimizada con el fin de obtener un aumento en la expresión a nivel del mRNA y también de la proteína (Disbrow et al. 2003; Ward et al. 2011). La secuencia de rata optimizada, or*Galns*, donde la “r” indica el origen de rata y la “o” la optimización de la secuencia, se clonó en un plásmido pAAV-CAG, que contenía el promotor ubicuo CAG y las ITR (*Inverted Terminal Repeats*) del vector AAV2 (Figura 40). El plásmido resultante se denominó pAAV-CAG-or*Galns*.



Figura 40. Representación esquemática del constructo que contiene la secuencia codificante optimizada de la enzima GALNS de rata. El constructo está formado por 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.

El plásmido pAAV-CAG-or*Galns* se utilizó para la producción del vector AAV9 mediante un sistema de triple transfección en células HEK293 y posterior purificación por gradientes de CsCl (ver Materiales y Métodos). El vector viral resultante se nombró AAV9-CAG-or*Galns* (AAV9-*Galns*).

2. APROXIMACIÓN DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE MORQUIO A BASADA EN LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE AAV9-GALNS EN RATAS MACHO MPS IVA

Para evaluar la eficacia terapéutica del vector AAV9-*Galns*, se administró sistémicamente, a través de la vena caudal de la cola, una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata ($6,67 \times 10^{13}$ vg/kg) a ratas macho MPS IVA de 4 semanas de edad (Figura 41). Además, el grupo experimental también lo formaron ratas sanas WT y MPS IVA no tratadas.

La MPS IVA es una enfermedad con afectación en el crecimiento esquelético, por lo que el tratamiento temprano es importante para evitar alteraciones irreparables. Por ello, las ratas MPS IVA se trataron con el vector AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad, una edad comparable a la de un niño diagnosticado a los pocos años de vida (Barrow 2007). Con el objetivo de evaluar la capacidad del vector terapéutico para revertir las alteraciones patológicas detectadas en las ratas MPS IVA, se realizó un seguimiento de las ratas a 3 edades distintas tras la administración del vector.

En primer lugar, se realizó un estudio en ratas jóvenes de 2 meses de edad, en plena etapa de crecimiento, lo que permitió analizar si el tratamiento era capaz de contrarrestar la patología observada en el crecimiento esquelético de las ratas MPS IVA. Para ello, se realizaron análisis histológicos de la placa de crecimiento y análisis de microtomografía computarizada (μ CT) para evaluar la correcta osificación de los huesos largos. Además, se realizó un estudio de *Grip Strength Test* (GST) para evaluar si la corrección de la patología ósea se traducía en una mejora de la fuerza de agarre.

Cuando alcanzaron los 6 meses de edad, se analizó el efecto terapéutico de AAV9-*Galns* mediante determinación de los niveles de expresión y actividad GALNS en diversos tejidos, el contenido de KS por LC-MS/MS, la distensión lisosomal mediante análisis histopatológicos, análisis ultraestructural por MET, evaluación del ritmo cardíaco y la fuerza de agarre mediante GST.

Finalmente, a los 12 meses de edad, se realizó un seguimiento para evaluar si el tratamiento con AAV9-*Galns* era capaz de mantener los niveles de KS normalizados a largo plazo (Figura 41).

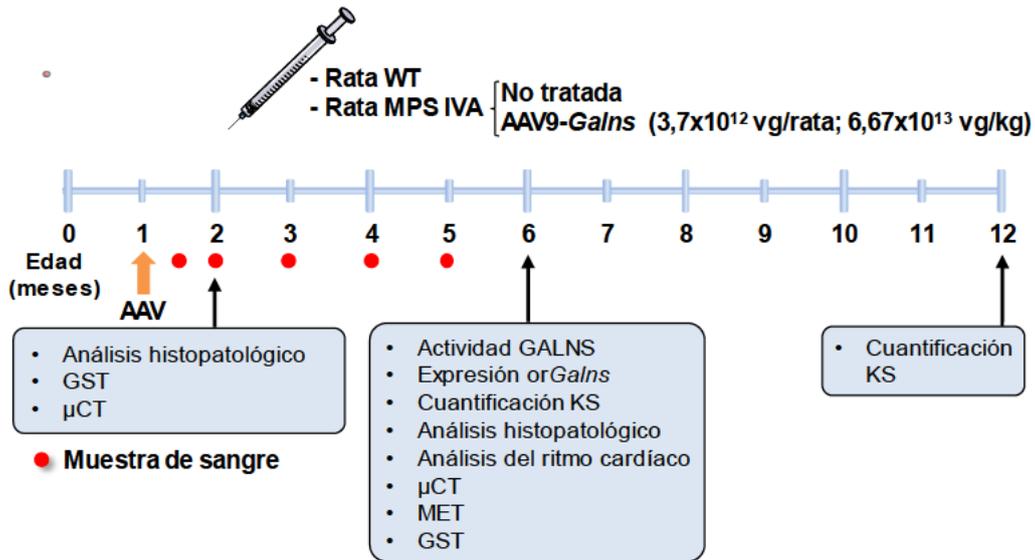


Figura 41. Diseño experimental. El vector AAV9-Galns se administró por vía intravenosa en ratas macho MPS IVA de 4 semanas de edad. La toma de muestras se realizó 1, 5 y 11 meses después de la administración del vector terapéutico, momento en el que se analizaron todos los parámetros que se indican en los distintos recuadros de la figura. Además, se tomaron muestras de sangre en distintos puntos del estudio para monitorizar la actividad GALNS y los niveles de KS circulantes. GST: *Grip Strength Test*; μ CT: microtomografía computarizada; MET: Microscopía Electrónica de Transmisión.

2.1. Efecto del tratamiento con AAV9-Galns sobre el tamaño corporal y la supervivencia de las ratas MPS IVA

Una de las principales características de los pacientes de Morquio A es la baja estatura como resultado de las alteraciones en la osificación endocondral (S. Tomatsu et al. 2011). Dado que las ratas MPS IVA mostraron una reducción en el peso y en la longitud corporal (Figura 20E,F), se analizó el efecto del tratamiento con AAV9-Galns sobre estos parámetros corporales.

Inicialmente, a las 4 semanas de edad, las ratas MPS IVA no tratadas presentaron un peso corporal similar al de las ratas WT. Lo mismo se observó en pacientes de Morquio A, los cuales presentaron un peso similar al de la población sana tras el nacimiento (Adriana M. Montaña et al. 2008). Sin embargo, a medida que los animales crecían, las ratas MPS IVA no tratadas experimentaron un incremento del peso corporal menor en comparación con el de las ratas WT. A la edad de 42 días, las ratas MPS IVA no tratadas ya se diferenciaron en 50 gramos respecto a los animales WT (WT: 197 g vs MPS IVA: 146 g), tal y como muestra la Figura 42A. De manera similar a los pacientes humanos, en los que la ganancia de peso con la edad es menor en comparación con la población sana (Adriana M. Montaña et al. 2008), las ratas MPS IVA también presentaron una marcada disminución en la ganancia de peso corporal durante todo el estudio (Figura 42A).

Dicha disminución no se observó en las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns*, ya que el tratamiento con el vector terapéutico permitió un aumento significativo en la ganancia de peso corporal, comparable al de las ratas WT (Figura 42A). Este incremento de peso se mantuvo a niveles cercanos a los de las ratas WT en todos los puntos analizados, evidenciando el efecto terapéutico de AAV9-*Galns* sobre el peso corporal.

Dada la corrección del peso corporal, se evaluó si el tratamiento con AAV9-*Galns* también era capaz de corregir la longitud naso-anal. A los 2 meses de edad, las ratas MPS IVA no tratadas mostraron valores de longitud menores ($17,59 \text{ cm} \pm 0,38$) en comparación con las ratas WT ($21,43 \text{ cm} \pm 0,17$) (Figura 42B). Sin embargo, las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* mostraron valores de longitud naso-anal indistinguibles ($20,58 \text{ cm} \pm 0,53$) de aquellos obtenidos en ratas WT, tal y como muestra la Figura 42B. Estos resultados sugirieron una normalización del tamaño corporal, tanto del peso corporal como de la longitud naso-anal, en las ratas MPS IVA tratadas con el vector terapéutico.

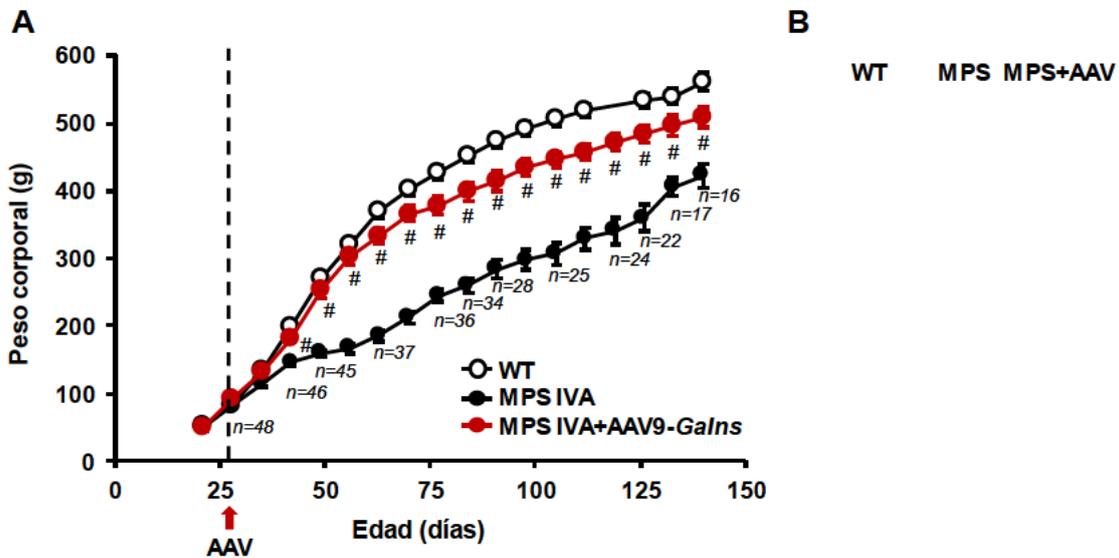


Figura 42. Efecto del tratamiento con AAV9-*Galns* en el peso y longitud corporal. (A) Seguimiento del peso corporal en ratas WT ($n=13-49$), MPS IVA sin tratar ($n=16-48$) y MPS IVA tratadas ($n=13-29$) a las 4 semanas de edad con $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata del vector AAV9-*Galns*. Las variaciones en la n del grupo dependen tanto de las muertes de los animales como de salidas de ratas de su grupo experimental debido a tomas de muestras. (B) Imagen representativa de ratas WT, MPS IVA no tratadas y tratadas con AAV9-*Galns* de 2 meses de edad. Las ratas tratadas con el vector terapéutico obtuvieron valores de longitud naso-anal muy cercanos a los de las ratas WT (WT: $21,43 \text{ cm} \pm 0,17$; MPS IVA no tratado: $17,59 \text{ cm} \pm 0,38$; MPS IVA+AAV9-*Galns*: $20,58 \text{ cm} \pm 0,53$; $n=8-11$). Los resultados se muestran como media \pm SEM; $P < 0,001$ vs MPS IVA sin tratar.

En pacientes con Morquio A se observó una reducción de la esperanza de vida, con una mortalidad incrementada en la segunda o tercera década en los casos con fenotipos más severos de la enfermedad (A. M. Montaña, Tomatsu, et al. 2007; S. Tomatsu et al. 2011). En el caso de las ratas MPS IVA, se observó que la deficiencia de actividad GALNS provocaba también una reducción considerable de la esperanza de vida. El número de ratas MPS IVA no tratadas del grupo experimental fue disminuyendo progresivamente con el paso del tiempo, a causa de la reducción de la tasa de supervivencia observada en dichos animales (Figura 43). Alrededor de los 60 días de edad, se observó una mortalidad acentuada en el grupo de ratas MPS IVA no tratadas, que correlacionó con la reducción más marcada del peso corporal observada a dicha edad (Figura 42). El aumento de peso de las ratas MPS IVA no tratadas observado a la edad de 133-140 días (los dos últimos puntos del estudio de peso corporal), fueron probablemente debidos a que solamente las ratas que sobrevivieron, que tenían mejor peso, llegaron al final del estudio de peso corporal (Figura 42). Mientras que a los 8 meses de edad (250 días) más del 90% de las ratas WT seguían vivas, aproximadamente el 70% de las ratas MPS IVA ya habían muerto (Figura 43). En cambio, las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* mostraron una mejor tasa de supervivencia, ya que aproximadamente el 80% de las ratas tratadas sobrevivieron hasta alcanzar el final del estudio de supervivencia (Figura 43).

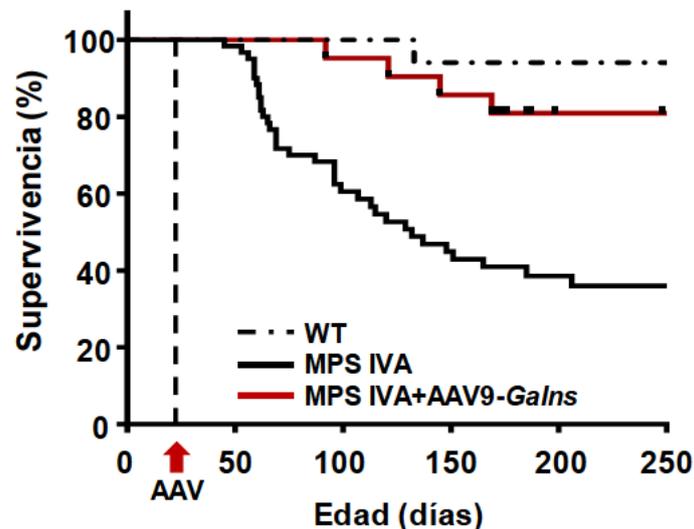


Figura 43. Efecto del tratamiento con AAV9-*Galns* en la supervivencia de ratas MPS IVA. Análisis de supervivencia por Kaplan-Meier de ratas WT (n=17), MPS IVA no tratadas (n=76) y MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* (n=32). Al final del estudio (250 días de edad), las ratas MPS IVA no tratadas mostraron una tasa de supervivencia de aproximadamente el 30%, que fue significativamente menor en comparación con la tasa de supervivencia de las ratas WT a la misma edad ($P < 0,0001$ vs MPS IVA). Los animales MPS IVA administrados con vectores AAV9-*Galns* a una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata mostraron una tasa de supervivencia más elevada (del 80%) en comparación a las ratas MPS IVA no tratadas, a la edad de 8 meses (7 meses después del tratamiento).

2.2. Incremento de la actividad GALNS circulante y corrección del contenido de KS en suero tras el tratamiento con AAV9-*Galns*

La mejora en el tamaño corporal (peso y longitud) y en la supervivencia indicó que muy probablemente el tratamiento con AAV9-*Galns* resultaba en un incremento en la actividad GALNS y en una reducción de los acúmulos de GAGs en los diferentes tejidos. Por ello, se realizó un seguimiento de la actividad GALNS en suero de forma periódica en las ratas WT, MPS IVA y MPS IVA tratadas con el vector AAV9-*Galns*. Una semana tras la administración del vector terapéutico, se obtuvo el valor máximo de actividad GALNS en suero, alcanzando valores que doblaban a los de los observados en ratas WT (Figura 44A). La reducción de actividad GALNS observada a continuación fue debida, en parte, a la pérdida de genomas virales a causa de la elevada tasa de replicación de los tejidos, ya que entre los 30-60 días de edad las ratas experimentaron un incremento del peso corporal exponencial, pasando de unos 100 g a casi 300 g en 3 semanas (Figura 42A). No obstante, se observó que la actividad GALNS circulante de las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* se mantenía a niveles estables a lo largo de todo el tiempo del estudio, alcanzando valores indistinguibles a los de los animales WT (Figura 44A).

La presencia de actividad GALNS en suero resultó en una completa normalización de los niveles de KS circulantes en las ratas tratadas con AAV9-*Galns* (Figura 44B). Mientras que las ratas MPS IVA presentaron unos niveles de KS elevados en todos los puntos del estudio, el tratamiento con AAV9-*Galns* consiguió reducir estos niveles hasta valores prácticamente indistinguibles a los obtenidos en ratas WT (Figura 44B). Esta normalización se mantuvo a largo plazo, ya que las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* presentaron una concentración de KS circulante similar al de las ratas WT a los 12 meses de edad (Figura 44C).

Estos resultados demostraron la eficacia a largo plazo del tratamiento IV con AAV9-*Galns* en la normalización de actividad GALNS circulante y en la reversión de los niveles de KS en suero de las ratas MPS IVA.

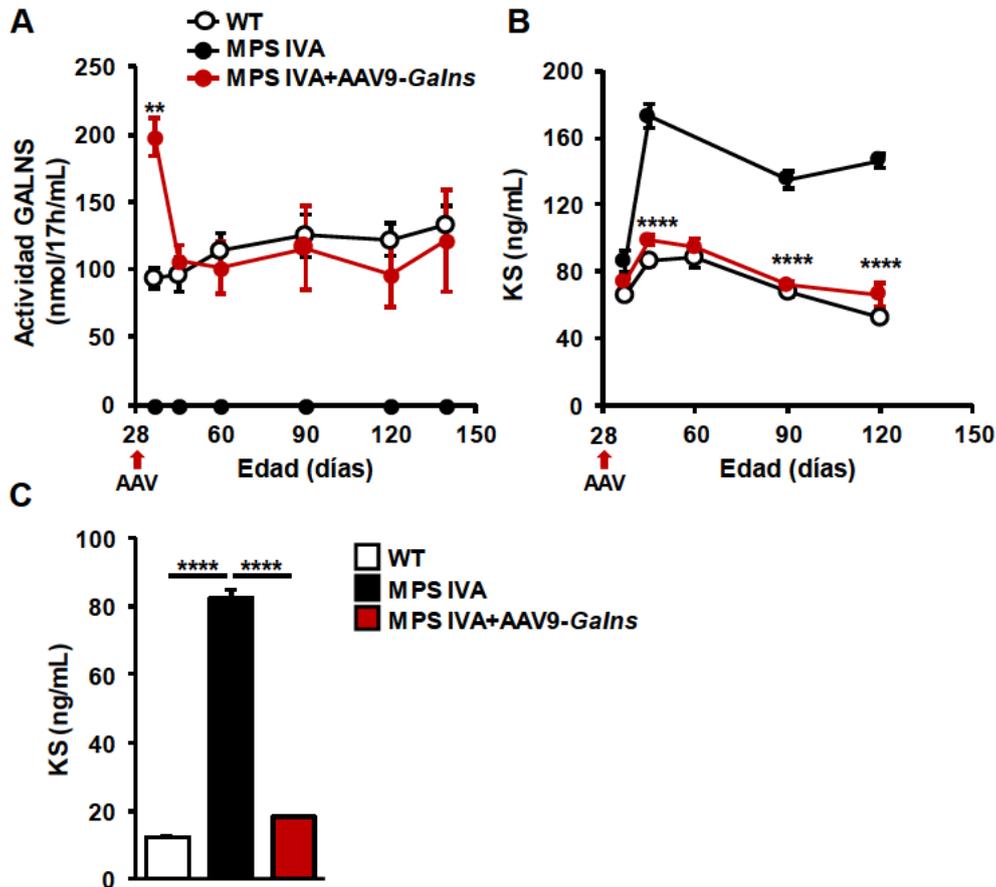


Figura 44. Incremento de la actividad GALNS circulante y normalización del contenido de KS en las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-Galns. **(A)** Seguimiento de la actividad GALNS circulante de ratas WT (n=4-5), MPS IVA no tratadas (n=5) y MPS IVA tratadas a las 4 semanas de edad con vectores AAV9-Galns en una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata (n=8-18). **(B)** Cuantificación del contenido de KS por LC-MS/MS en suero de ratas WT (n=2-5), MPS IVA no tratadas (n=2-5) y MPS IVA tratadas con AAV9-Galns (n=4-7) en distintos tiempos después de la administración del vector. **(C)** Cuantificación del contenido de KS en suero de ratas WT y ratas MPS IVA no tratadas y tratadas con el vector AAV9-Galns de 12 meses de edad. n=2-4 animales por grupo. Los resultados se muestran como media \pm SEM. ** $P < 0,01$ y **** $P < 0,0001$ vs MPS IVA no tratadas.

2.3. Efecto del tratamiento con AAV9-Galns en hígado y tejido adiposo de ratas MPS IVA

La administración intravenosa del vector AAV9 resulta en una elevada transducción tanto del hígado (Sands 2011), como del tejido adiposo (Jimenez et al. 2013). Estos dos órganos tienen un gran potencial secretor y son capaces de aportar una importante cantidad de proteínas al riego sanguíneo, entre ellas enzimas lisosomales, como por ejemplo GALNS. En el contexto de la MPS IVA, la secreción continuada de GALNS por parte del hígado y del tejido adiposo a la circulación sanguínea podría permitir la corrección de la patología lisosomal en otros tejidos periféricos no transducidos, gracias al mecanismo de corrección cruzada (Figura 2) (Tessitore et al. 2008; Ruzo, Garcia, et al. 2012; Ruzo, Marcó, et al. 2012). Por ello, se

analizó la eficacia de transducción en el hígado y el tejido adiposo tras la administración intravenosa del vector AAV9-*Galns*.

La capacidad del vector AAV9 para transducir el hígado eficientemente (Figura 38) se tradujo en un incremento de expresión *orGalns* y de actividad GALNS hepática en ratas MPS IVA tras 5 meses de la administración IV del vector terapéutico (Figura 45A,B). Los valores de actividad GALNS de las ratas tratadas con AAV9-*Galns* alcanzaron valores 3 veces superiores a los observados en ratas WT (Figura 45B). Como consecuencia del aumento en la actividad GALNS en el hígado, se produjo una completa normalización de los niveles de KS hepáticos. Esta normalización no sólo se observó 5 meses tras la administración del vector terapéutico, sino que se mantuvo a largo plazo, tras 11 meses de tratamiento (Figura 45C).

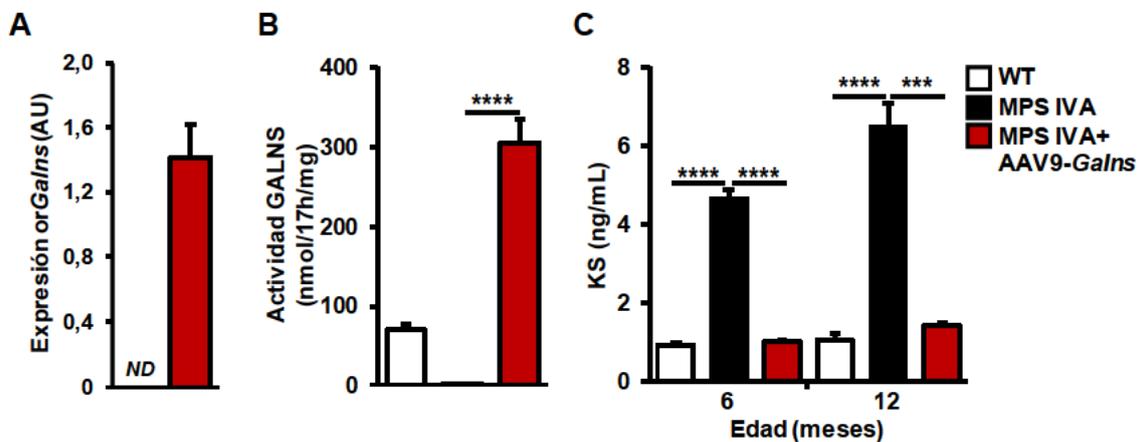


Figura 45. Aumento de la actividad GALNS y corrección de la acumulación de KS hepático a largo plazo. (A) Expresión hepática de *orGalns* en ratas de 6 meses WT (n=2) y ratas MPS IVA tratadas (n=7) a las 4 semanas de edad con $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata de AAV9-*Galns*. Los animales tratados mostraron un aumento significativo de la expresión de *orGalns*. (B) Actividad GALNS hepática en ratas WT, MPS IVA no tratadas y tratadas con AAV9-*Galns* de los 6 meses de edad. n=5-7 animales por grupo. (C) Cuantificación del contenido de KS por LC-MS/MS en el hígado de ratas de 6 y 12 meses de edad WT, MPS IVA no tratadas y tratadas con AAV9-*Galns*. n=2-7 animales por grupo. Los resultados se muestran como media \pm SEM. *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ vs ratas MPS IVA sin tratar. ND: No detectable.

Dado que las ratas MPS IVA presentaron elevados niveles de KS en el hígado, se evaluó el efecto del tratamiento sobre la patología hepática mediante el análisis de cortes histológicos del hígado por inmunofluorescencia contra el marcador lisosomal LIMP2. Mientras que las ratas MPS IVA no tratadas mostraron signos de distensión lisosomal en las células de Kupffer a los 6 meses de edad, las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* mostraron una completa normalización de la distensión lisosomal (Figura 46A). El efecto del tratamiento con AAV9-*Galns* en el hígado también se analizó mediante un estudio ultraestructural a los 6 meses de edad. El análisis de MET evidenció que las células de Kupffer de ratas MPS IVA presentaban múltiples vesículas de almacenamiento electrolúcido. En cambio, las células de Kupffer de ratas MPS IVA

tratadas con AAV9-*Galns* eran indistinguibles a las observadas en ratas WT (Figura 46B). Estos resultados confirmaron la eficacia terapéutica de la aproximación de terapia génica basada en la administración IV de AAV9-*Galns* en la reversión de la distensión lisosomal hepática.

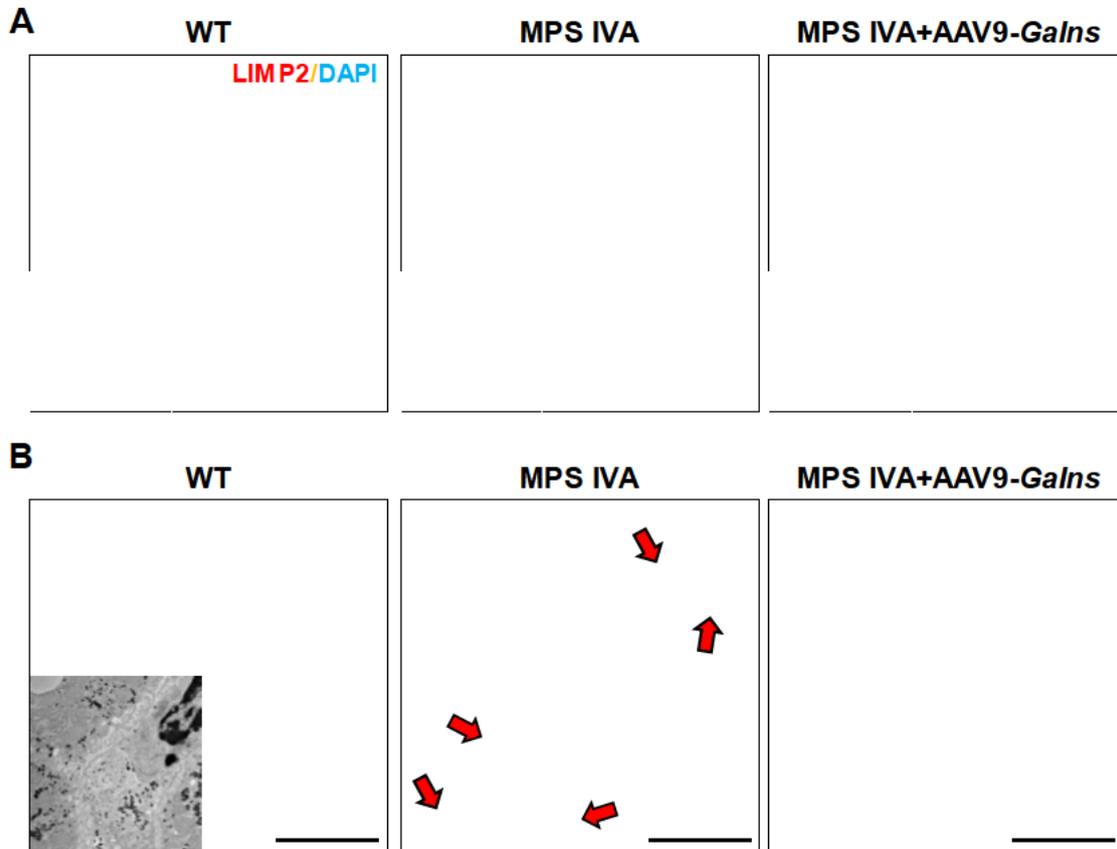


Figura 46. Corrección de la distensión lisosomal en hígado. Análisis del hígado a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad. **(A)** Fotomicrografías representativas del análisis por inmunofluorescencia contra LIMP2 en secciones histológicas de hígado. Las ratas MPS IVA tratadas no mostraron signos de distensión lisosomal. En cambio, las ratas MPS IVA no tratadas mostraron un incremento en la expresión de LIMP2, evidenciando distensión lisosomal. **(B)** Imágenes representativas del análisis ultraestructural de células de Kupffer del hígado. Se detectó un gran número de vacuolas electrolúcidas (flechas rojas) en las células de Kupffer de las ratas MPS IVA no tratadas, pero no en ratas WT o tratadas con AAV9-*Galns*. Barra de escala: 5 μ m.

En muchas MPS se ha observado que la falta de la actividad enzimática causante de la enfermedad provoca a la vez alteraciones en la homeóstasis lisosomal, generando alteraciones secundarias en la actividad de otras enzimas lisosomales (Sardiello et al. 2009; Ribera et al. 2015; Motas et al. 2016). Para evaluar el efecto del tratamiento con AAV9-*Galns* sobre las actividades lisosomales secundarias, se midió la actividad enzimática de la enzima lisosomal β -Hexosaminidasa en el hígado de ratas WT y ratas MPS IVA sin tratar y tratadas con AAV9-*Galns* de 6 meses de edad. Los animales MPS IVA no tratados mostraron un aumento significativo (>2 veces) de la

actividad de la β -Hexosaminidasa en comparación con las ratas WT. En cambio, el tratamiento con AAV9-*Galns* redujo significativamente los niveles de actividad β -Hexosaminidasa a niveles cercanos a los observados en ratas WT (Figura 47). Por lo tanto, estos resultados demostraron que la restauración de actividad GALNS permitía una normalización de la actividad β -Hexosaminidasa en el hígado, lo que indicaría que la transferencia de AAV9-*Galns* también podría corregir la actividad de otras enzimas lisosomales alteradas en este órgano.

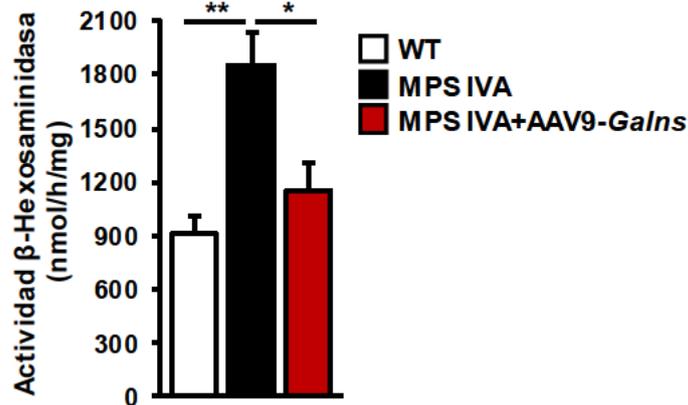


Figura 47. Normalización de la actividad β -Hexosaminidasa en el hígado de ratas MPS IVA. Cuantificación de la actividad β -Hexosaminidasa en ratas WT y ratas MPS IVA no tratadas o tratadas con AAV9-*Galns* a una dosis de 3.7×10^{12} vg/rata. Cinco meses después del tratamiento, se observó una normalización de la actividad β -Hexosaminidasa en el hígado de ratas MPS IVA tratadas. Los resultados se muestran como media \pm SEM; n=5-7 animales por grupo. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs MPS IVA no tratadas.

De manera similar al hígado, el tratamiento con AAV9-*Galns* permitió un aumento significativo de la expresión or*Galns* y de la actividad GALNS en el tejido adiposo blanco epididimal (eWAT: *epididymal White Adipose Tissue*) en ratas MPS IVA tratadas (Figura 48A,B). Dichos niveles de actividad GALNS en las ratas tratadas alcanzaron valores de hasta 6 veces los observados en ratas WT (Figura 48B).

Además del hígado, el eWAT también tiene una alta capacidad secretora (Jimenez et al. 2013). Por lo tanto, ambos tejidos podrían representar la fuente principal de la elevada actividad GALNS circulante detectada en las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* (Figura 44A).

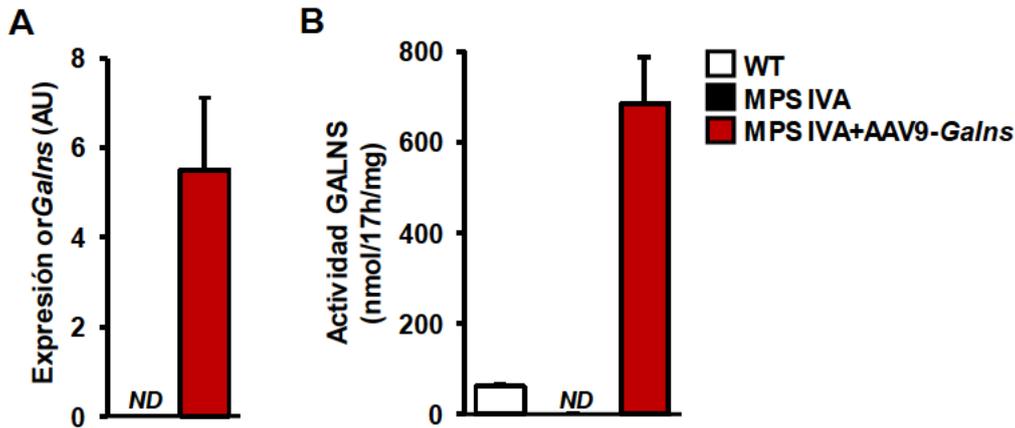


Figura 48. Determinación de la expresión de *orGalns* y la actividad GALNS en el eWAT. Análisis del tejido adiposo blanco epididimal (eWAT) a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad. **(A)** Expresión del mRNA de *orGalns* tras el análisis de qPCR. WT (n=2) y MPS IVA tratadas (n=7). **(B)** Análisis de la actividad GALNS. Las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* mostraron niveles de actividad casi 6 veces superiores a los de las ratas WT. n=5-7 animales por grupo. Los datos se muestran como media \pm SEM. *** $P < 0,001$ vs MPS IVA no tratadas. ND: no detectable.

2.4. Efecto de la administración intravenosa de AAV9-*Galns* sobre la patología ósea de las ratas MPS IVA

El estudio de biodistribución del vector AAV9-GFP demostró la eficiente transducción del hueso por parte de este vector (Figura 37). Dado que la principal alteración de los pacientes de Morquio A es la displasia esquelética, se evaluó si el tratamiento IV con el vector AAV9-*Galns* era capaz de mediar la expresión de *Galns* en el hueso de las ratas MPS IVA y de corregir los niveles de KS patológicos en este tejido.

La administración de AAV9-*Galns* permitió recuperar la expresión de *orGalns* en el hueso, alcanzando altos niveles de expresión *orGalns* en la epífisis y la diáfisis del fémur y de la tibia de las ratas MPS IVA, tras cinco meses de tratamiento (Figura 49A). La expresión de *orGalns* en el fémur de las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* se tradujo en un incremento del nivel de actividad GALNS femoral (Figura 49B). Este aumento de la actividad GALNS en el hueso dio como resultado la completa normalización del contenido de KS en la placa de crecimiento y en la diáfisis de fémur y tibia de ratas MPS IVA tratadas (Figura 50A,B).

Estos resultados demostraron la capacidad del vector AAV9-*Galns* para mediar expresión del gen *Galns* en el hueso, incrementando la actividad GALNS y normalizando los niveles de KS, tanto en la placa de crecimiento como en la diáfisis.

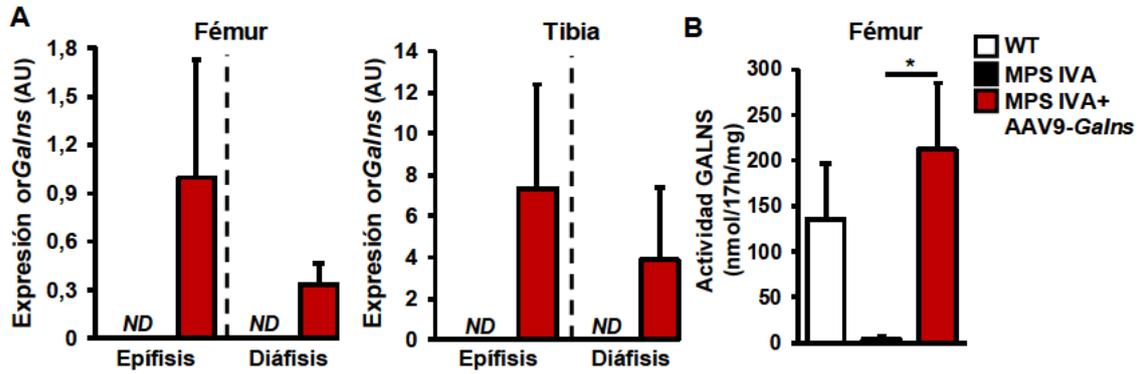


Figura 49. Restauración de la expresión y de la actividad GALNS en el hueso. Análisis del fémur y de la tibia a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-Galns a las 4 semanas de edad. **(A)** Expresión de orGalns en epífisis y diáfisis de fémur y tibia. $n=2-3$ animales por grupo. **(B)** Análisis de la actividad GALNS en fémur. El tratamiento con AAV9-Galns normalizó los niveles de actividad GALNS, alcanzando valores similares a los de los animales WT. $n=3$ animales por grupo. Los resultados se muestran como media \pm SEM; * $P < 0,05$ vs ratas MPS IVA sin tratar. ND: no detectable.

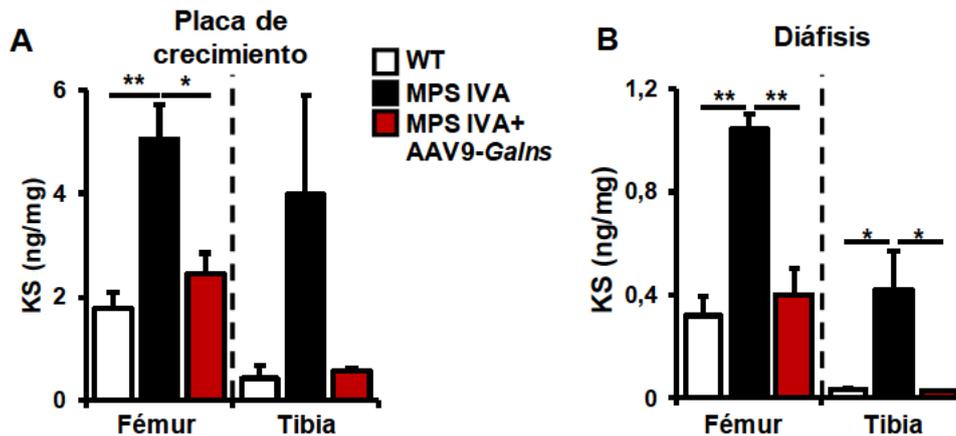


Figura 50. Normalización de los niveles de KS en el fémur y la tibia. Análisis del fémur y de la tibia a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-Galns a las 4 semanas de edad. **(A, B)** Cuantificación del contenido de KS por LC-MS/MS en placas de crecimiento **(A)** y diáfisis **(B)** de fémur y tibia. Los animales MPS IVA tratados mostraron una completa normalización del contenido de KS en los huesos, con valores muy similares a los observados en los WT. Los resultados se muestran como media \pm SEM; $n=3$ animales por grupo. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs ratas MPS IVA sin tratar.

Como se observó anteriormente, las ratas MPS IVA presentaron alteraciones a nivel de los condrocitos presentes en la placa de crecimiento, que en su mayoría podrían ser las principales causantes de las alteraciones esqueléticas observadas en estos animales (Figura 25). Por este motivo, se analizó el efecto terapéutico del vector AAV9-Galns en el cartílago de crecimiento de los huesos largos de animales jóvenes de 2 meses de edad. A esta edad es cuando la placa de crecimiento es más activa, dado que las ratas se encuentran en pleno crecimiento.

Los huesos largos crecen longitudinalmente gracias a un proceso conocido como osificación endocondral (Figura 10). Durante este proceso, el tejido cartilaginoso es sustituido progresivamente por tejido óseo, posibilitando así el crecimiento longitudinal del hueso. Durante la infancia, la fracción cartilaginosa presente en el hueso es mayor comparado con la de la etapa adulta, ya que este cartílago aún no ha sido sustituido por tejido óseo. Cuando se analizó la tibia de las ratas WT de dos meses de edad, mediante análisis histológico, se detectaron unas placas de crecimiento con una área amplia (Figura 51A). Esto era debido a que se trataba de ratas jóvenes en edad de crecimiento, por lo que presentaron una gran fracción cartilaginosa activa que aún no había sido sustituida por hueso.

En la zona de calcificación de la placa de crecimiento, la más cercana a la diáfisis, el cartílago se encuentra en contacto con la cavidad medular, la cual invade la región cartilaginosa. A medida que hay calcificación, las células hipertróficas del cartílago degeneran y son reabsorbidas, formando así el hueso trabecular (esponjoso), tal y como se pudo observar en la placa de crecimiento de las ratas WT (Figura 51A). Por contra, las ratas MPS IVA presentaron un tamaño menor del área de la placa de crecimiento y una zona de calcificación y osificación escasa, lo que sugería una menor formación de hueso trabecular, evidenciando un problema en la osificación endocondral (Figura 51A,B). Un mes después de la administración del vector AAV9-*Galns*, se observó que la placa de crecimiento de las ratas MPS IVA tenía un área muy similar a la de las ratas WT y una amplia zona de calcificación, lo que sugirió que el tratamiento con AAV9-*Galns* prevenía las alteraciones en la placa de crecimiento (Figura 51A,B).

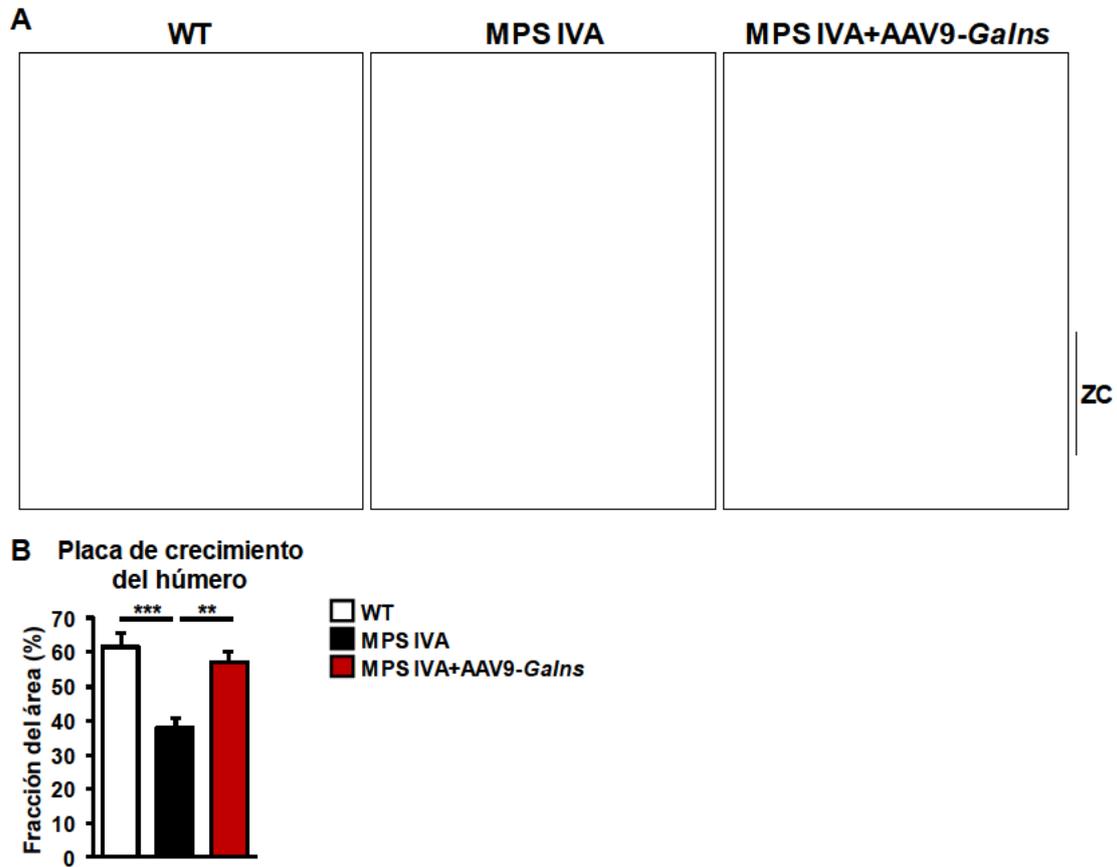


Figura 51. Efecto del tratamiento con AAV9-*Galns* en la placa de crecimiento. Análisis de la placa de crecimiento del húmero a los 2 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad. **(A)** Imágenes representativas de cortes histológicos del húmero teñidos con *Safranin Orange*. Las ratas MPS IVA mostraron placas de crecimiento reducidas y una menor presencia de células hipertroóficas degenerando en la ZC, lo que llevó a una menor calcificación de la matriz y a una menor presencia de hueso trabecular en comparación con ratas WT y tratadas (el color rojo de la tinción con *Safranin Orange* indica la fracción cartilaginosa). **(B)** Cuantificación del área ocupada por el cartilago de crecimiento en el húmero. La cuantificación se realizó a partir de la fracción cartilaginosa teñida con *Safranin Orange* (área roja) que se muestra en (A) respecto el área total de la imagen. ZC: Zona de calcificación. Los resultados se muestran como media \pm SEM; n=4-11 animales por grupo. ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs ratas MPS IVA sin tratar.

Dada la mejoría observada en la placa de crecimiento de las ratas MPS IVA tras un mes de tratamiento con AAV9-*Galns*, se realizó un estudio ultraestructural para evaluar si esta corrección se mantenía en huesos de ratas adultas, de 6 meses de edad.

En primer lugar, se analizó histológicamente el estado de las placas de crecimiento tibial. A los 6 meses de edad, se detectaron signos de hipertrofia en los condrocitos de las zonas en reposo y proliferación de las placas de crecimiento de las ratas MPS IVA (Figura 52A). El tratamiento con AAV9-*Galns* redujo significativamente la presencia de estos condrocitos hipertroóficos, tras 5 meses de la administración del vector terapéutico (Figura 52A). La placa de crecimiento también se analizó mediante análisis ultraestructural por MET, el cuál reveló un gran número de pequeñas vacuolas de material poco electrodenso en el citoplasma de los condrocitos proliferativos de las

ratas MPS IVA no tratadas (Figura 52B). En cambio, la administración del vector terapéutico permitió una importante disminución del número de vacuolas de almacenamiento electrolúcido en placas de crecimiento de ratas MPS IVA (Figura 52B). Estos resultados indicaban un efecto terapéutico en la placa de crecimiento tras 5 meses de la administración IV del vector AAV9-*Galns*, evidenciando que la mejoría observada a 2 meses se mantenía con el paso del tiempo.

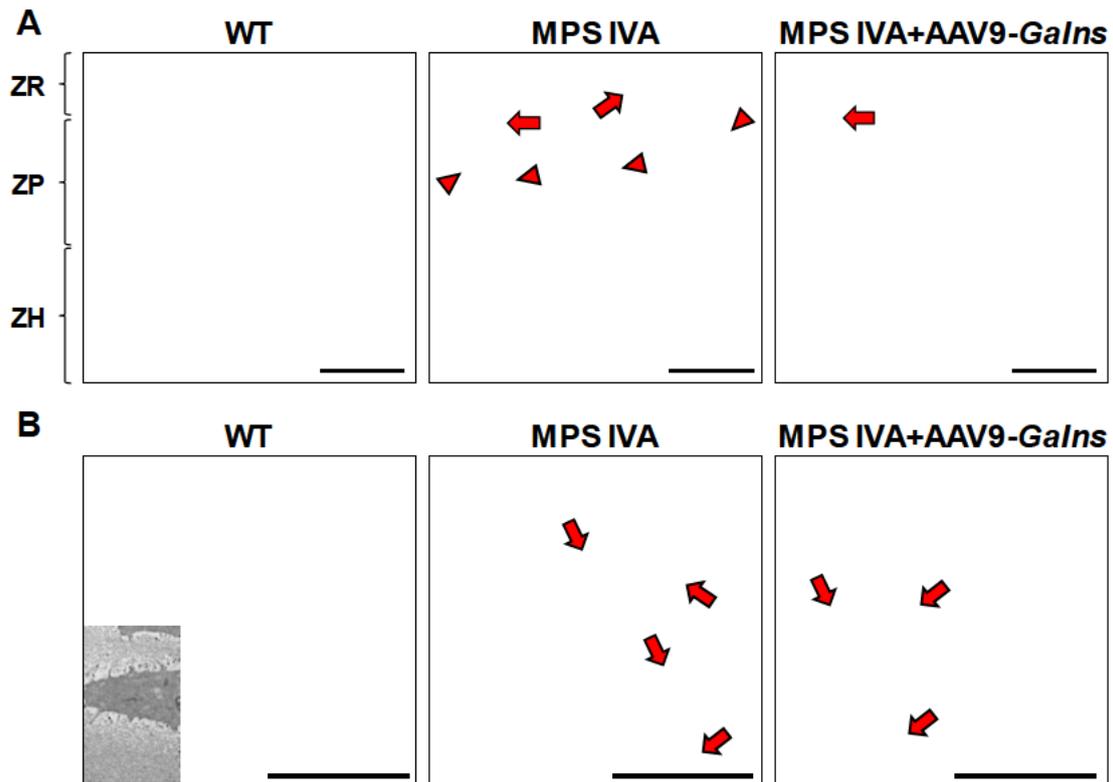


Figura 52. Reducción de la hipertrofia de condrocitos de la placa de crecimiento. Análisis de la placa de crecimiento de la tibia a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad. **(A)** Fotomicrografías representativas de la tinción con azul de toluidina de las secciones semifinas de la tibia. Las ratas MPS IVA tratadas mostraron una clara mejoría en la presencia de condrocitos hipertróficos, los cuáles se observaron en la ZR (flechas rojas) y ZP (puntas de flecha rojas) de las ratas MPS IVA no tratadas. Barras de escala: 50 μ m. **(B)** Análisis ultraestructural de la ZP tibial. La administración de vectores terapéuticos redujo la mayor parte de las vesículas electrolúcidas de almacenamiento intracelular (flechas rojas) de los condrocitos. Barras de escala: 10 μ m. n=2-3 animales por grupo. ZR: Zona de Reposo, ZP: Zona Proliferativa, ZH: Zona Hipertrófica.

Con el objetivo de valorar si la mejora del fenotipo observado en la placa de crecimiento se traducía en una correcta formación del hueso, se analizaron por microtomografía computarizada (μ CT) el fémur y la tibia de ratas jóvenes a los dos meses de edad. En los huesos largos existen dos tipos de tejido óseo, el hueso compacto o cortical y el hueso esponjoso o trabecular (Figura 53). El hueso compacto se encuentra principalmente en la diáfisis o porción central del hueso largo, en cambio,

el hueso trabecular se encuentra en la epífisis o extremos de los huesos largos y en el interior de otros huesos (Figura 53).

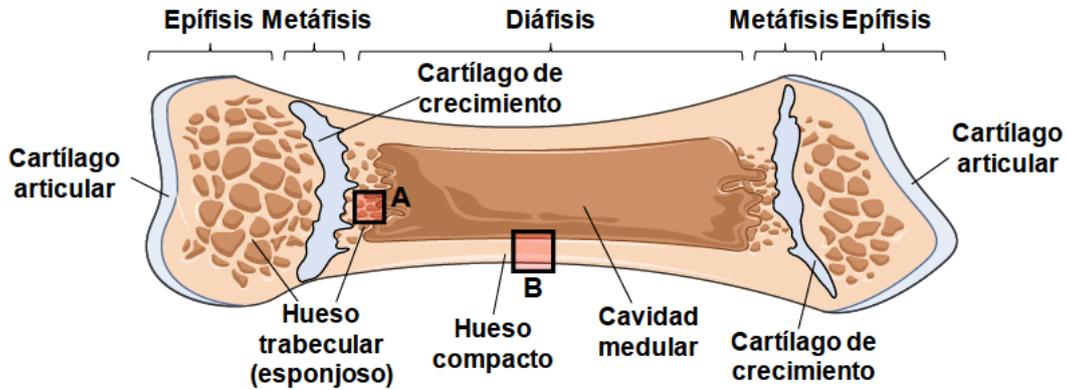


Figura 53. Esquema de la anatomía del hueso largo. Un hueso largo, como el fémur o la tibia, está dividido en epífisis (extremos), metáfisis (zona intermedia donde se encuentra la placa de crecimiento) y diáfisis (zona central). El hueso trabecular se encuentra mayoritariamente en las epífisis y en la zona adyacente a la metáfisis. Este tipo de hueso forma una estructura esponjosa en la que se intercala la médula ósea. Los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes y oxígeno entre la sangre y los osteocitos del interior del hueso trabecular. El recuadro rojo **A** indica la fracción de hueso trabecular analizada mediante μ CT en la presente tesis doctoral. Por otro lado, el hueso compacto está formado por tejido óseo denso que rodea la cavidad medular de la diáfisis. El recuadro rojo **B** indica la fracción de hueso compacto analizada mediante μ CT en la presente tesis doctoral.

Al analizar el *tejido óseo trabecular* adyacente a la placa de crecimiento (Figura 53, recuadro A), se observó que el tratamiento con *AAV9-Galns* era capaz de normalizar los parámetros óseos, como la composición y densidad ósea, tanto en el fémur (Figura 54A) como en la tibia (Figura 54B). El tratamiento con *AAV9-Galns* también fue capaz de normalizar la estructura ósea, dado que se normalizaron los valores de espesor, número y espaciado trabecular, en comparación con las ratas MPS IVA no tratadas (Figura 54A,B). En conjunto, los resultados observados en las ratas MPS IVA tratadas con el vector *AAV9-Galns* evidenciaron un proceso de osificación normal que correlacionó con los resultados observados en la placa de crecimiento.

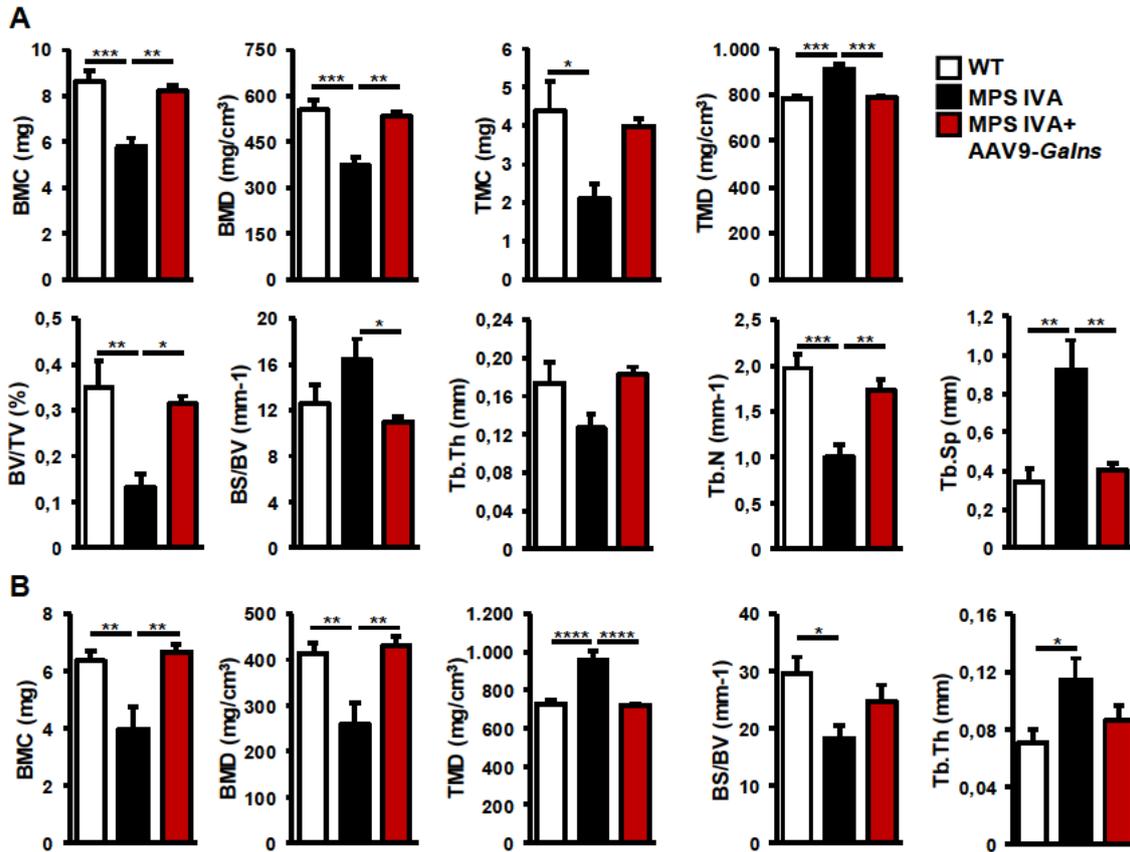


Figura 54. Normalización de los parámetros óseos en el hueso trabecular. Análisis del hueso trabecular del fémur y de la tibia a los 2 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-Galns a las 4 semanas de edad. **(A)** Cuantificación mediante μ CT del contenido mineral óseo (BMC: *Bone Mineral Content*), la densidad mineral ósea (BMD: *Bone Mineral Density*), el contenido de masa de tejido (TMC: *Tissue Mass Content*), la densidad de masa de tejido (TMD: *Tissue Mass Density*), el volumen óseo/volumen de tejido (BV/TV: *Bone Volume/Tissue Volume*), la superficie ósea/volumen óseo (BS/BV: *Bone Surface/Bone Volume*), el espesor trabecular (Tb.Th), el número de trabéculas (Tb.N) y el espaciamiento trabecular (Tb.Sp) en el hueso trabecular del fémur. **(B)** Cuantificación del BMC, la BMD, la TMD, la BS/BV y el Tb.Th en tibia. Los resultados se muestran como media \pm SEM; n=4-5 animales por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ vs MPS IVA sin tratar.

A continuación, se analizó mediante μ CT el estado del *hueso compacto* de la diáfisis del fémur y de la tibia (Figura 53, recuadro B). El tratamiento con AAV9-Galns mantuvo los parámetros óseos normales en el hueso compacto de las ratas MPS IVA tras un mes de tratamiento. En comparación con las ratas MPS IVA no tratadas, las ratas MPS IVA tratadas con el vector terapéutico mostraron valores de densidad y composición ósea cercanos a aquellos observados en ratas WT tanto en el fémur (Figura 55A) como en la tibia (Figura 55B).

Estos resultados proporcionaron una fuerte evidencia del potencial de este enfoque de terapia génica para contrarrestar la patología ósea observada en las ratas MPS IVA, mejorando el fenotipo observado en la placa de crecimiento, en el hueso trabecular y en el hueso compacto en las ratas jóvenes (2 meses de edad) tratadas a las 4 semanas con AAV9-Galns.

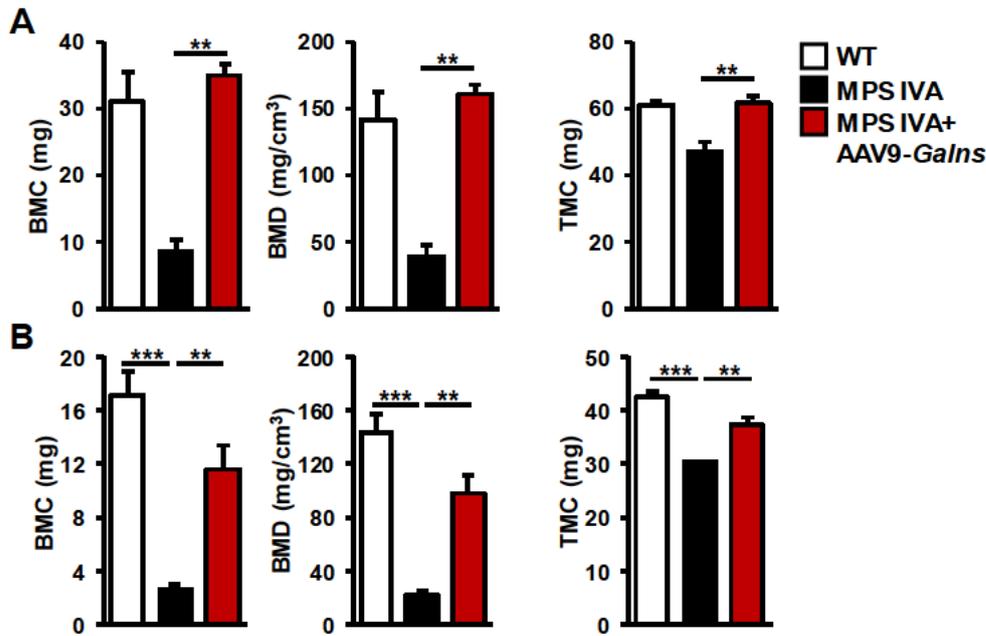


Figura 55. Corrección de los valores óseos alterados en el hueso compacto. Análisis del hueso compacto del fémur y de la tibia a los 2 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-Galns a las 4 semanas de edad. **(A, B)** Cuantificación del BMC, la BMD y la TMC en la diáfisis del fémur (A) y de la tibia (B). Los resultados se muestran como media \pm SEM; n=4-5 animales por grupo. ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs MPS IVA sin tratar.

Dado que las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-Galns presentaban una normalización en los parámetros óseos a los dos meses de edad, se decidió analizar si esta corrección se mantenía a una edad más avanzada, mediante un análisis de μ CT en ratas adultas de 6 meses de edad. Las ratas MPS IVA mostraron una densidad mineral ósea y un contenido mineral óseo disminuidos, junto con alteraciones trabeculares en el fémur a dicha edad (Figura 56A,B). Por contra, las ratas MPS IVA tratadas con el vector AAV9-Galns, mostraron una clara mejoría en el contenido mineral óseo, la densidad mineral ósea y el contenido de masa de tejido del hueso compacto del fémur (Figura 56A). Además, el tratamiento con el vector terapéutico normalizó el grosor, el número y el espaciado trabecular en el hueso trabecular femoral, alcanzando valores similares a los observados en animales WT (Figura 56B). También se obtuvieron resultados similares en el hueso compacto de la tibia de ratas MPS IVA tratadas con AAV9-Galns (Figura 56C). Esta normalización de los parámetros óseos correlacionó con la completa recuperación de la longitud de la tibia tras la administración del vector terapéutico (Figura 56D).

En conjunto, estos resultados indicaron que el tratamiento con el vector AAV9-Galns era capaz de revertir la patología ósea observada en ratas MPS IVA, normalizando el crecimiento de huesos largos.

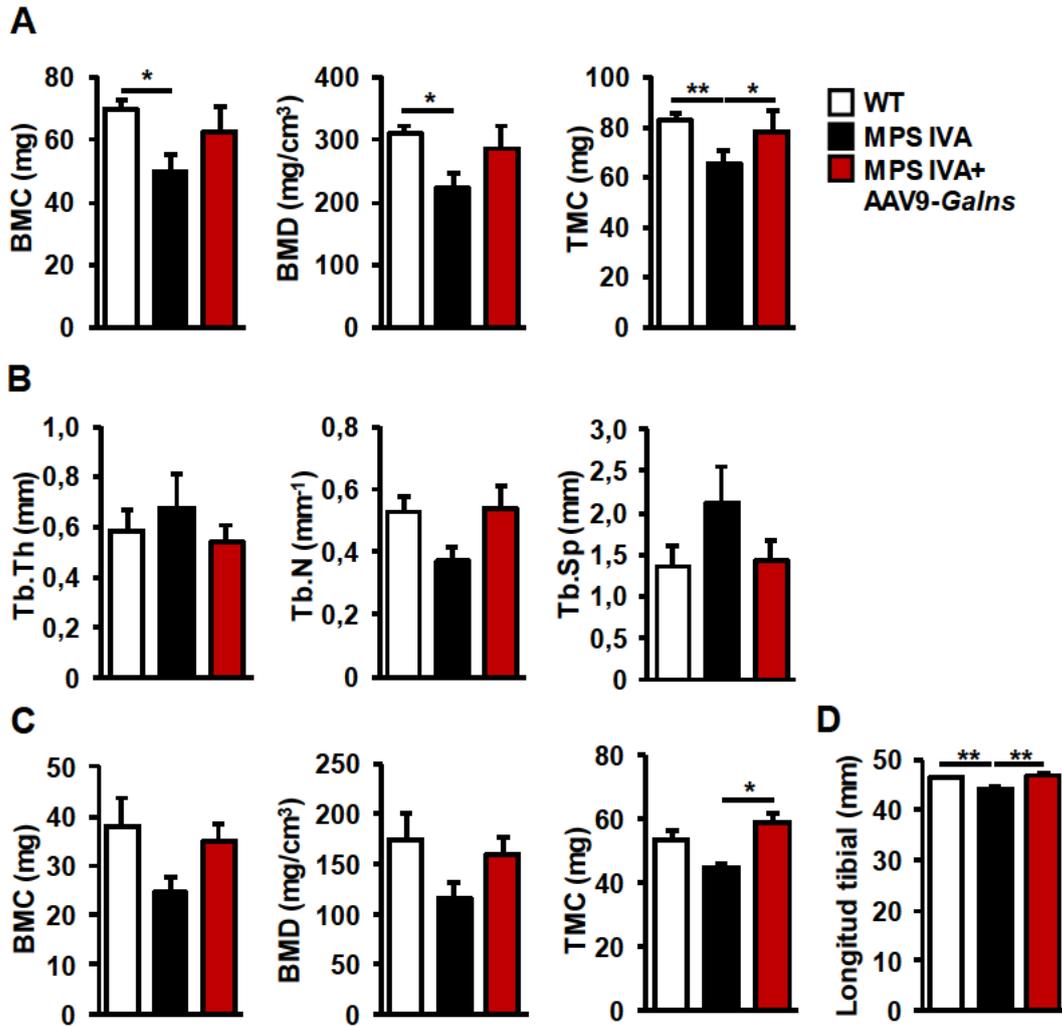


Figura 56. Normalización de los parámetros óseos normales en ratas MPS IVA de 6 meses de edad. Análisis del hueso trabecular y compacto del fémur y de la tibia a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-Galns a las 4 semanas de edad. **(A)** Cuantificación del BMC, la BMD y el TMC del hueso compacto del fémur. **(B)** Cuantificación del Tb.Th, del Tb.N y del Tb.Sp en el hueso trabecular femoral. **(C)** Cuantificación de BMC, BMD y TMC del hueso compacto de la tibia. **(D)** Cuantificación de la longitud de la tibia desde el cóndilo medial hasta el maléolo medial. Únicamente las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-Galns normalizaron la longitud tibial en comparación con ratas MPS IVA no tratadas. Los resultados se muestran como media \pm SEM; $n=4-5$ animales por grupo. * $P<0,05$ y ** $P<0,01$ vs MPS IVA sin tratar.

2.5. Efecto de la administración intravenosa de vector AAV9-Galns sobre las articulaciones de las ratas MPS IVA

Las ratas MPS IVA desarrollaron las alteraciones osteoartísticas características que sufren los pacientes de Morquio A en las articulaciones (Shunji Tomatsu et al. 2014). Para evaluar el efecto del tratamiento con AAV9-Galns sobre la patología articular de las ratas MPS IVA, se analizó el estado de la epífisis distal del fémur. En esta región del hueso, en la que se encuentra el cartílago articular de la rodilla, se observó que el tratamiento con el vector AAV9-Galns era capaz de reducir de forma significativa el

contenido de KS en las ratas tratadas, 5 meses después de la administración intravenosa del vector terapéutico (Figura 57).

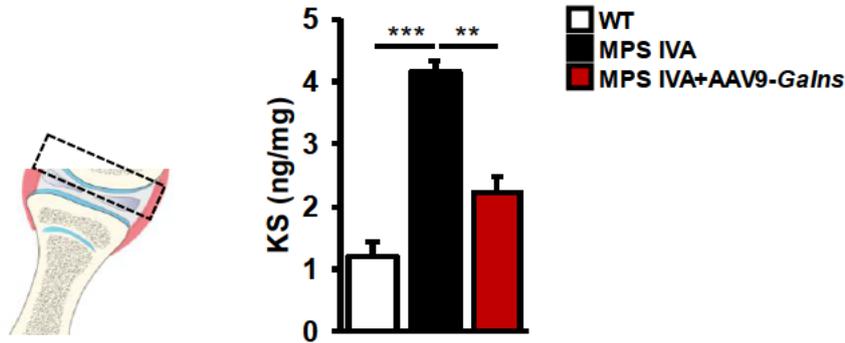


Figura 57. Reducción de la acumulación de KS en la epífisis distal del fémur. Cuantificación del contenido de KS en la epífisis distal del fémur de ratas WT de 6 meses de edad y ratas MPS IVA no tratadas y tratadas a las 4 semanas de edad con $3,7 \times 10^{12}$ vg de AAV9-Galns. Las ratas MPS IVA tratadas mostraron niveles de KS significativamente más bajos que las ratas MPS IVA no tratadas. El recuadro indica la epífisis distal del fémur analizada. Los resultados se muestran como media \pm SEM; n=3 animales por grupo. **P<0,01 y ***P<0,001 vs ratas MPS IVA no tratadas.

Dado que las ratas MPS IVA presentaron signos de hipertrofia de condrocitos en la capa superficial del cartílago articular que podrían generar problemas articulares (Figura 26 y 27), se decidió analizar el efecto terapéutico de AAV9-Galns sobre este tejido cartilaginoso. Mediante el análisis histológico de secciones del cartílago articular del húmero teñido con *Safranin Orange*, se evidenció que el tratamiento con el vector terapéutico era capaz de reducir la presencia de condrocitos hipertróficos en las zonas más superficiales del cartílago articular en las ratas MPS IVA (Figura 58A). Además, el análisis ultraestructural por MET del cartílago articular tibial de las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-Galns confirmó la desaparición de las vesículas electrolúcidas en los condrocitos de la capa superficial del cartílago (Figura 58B).

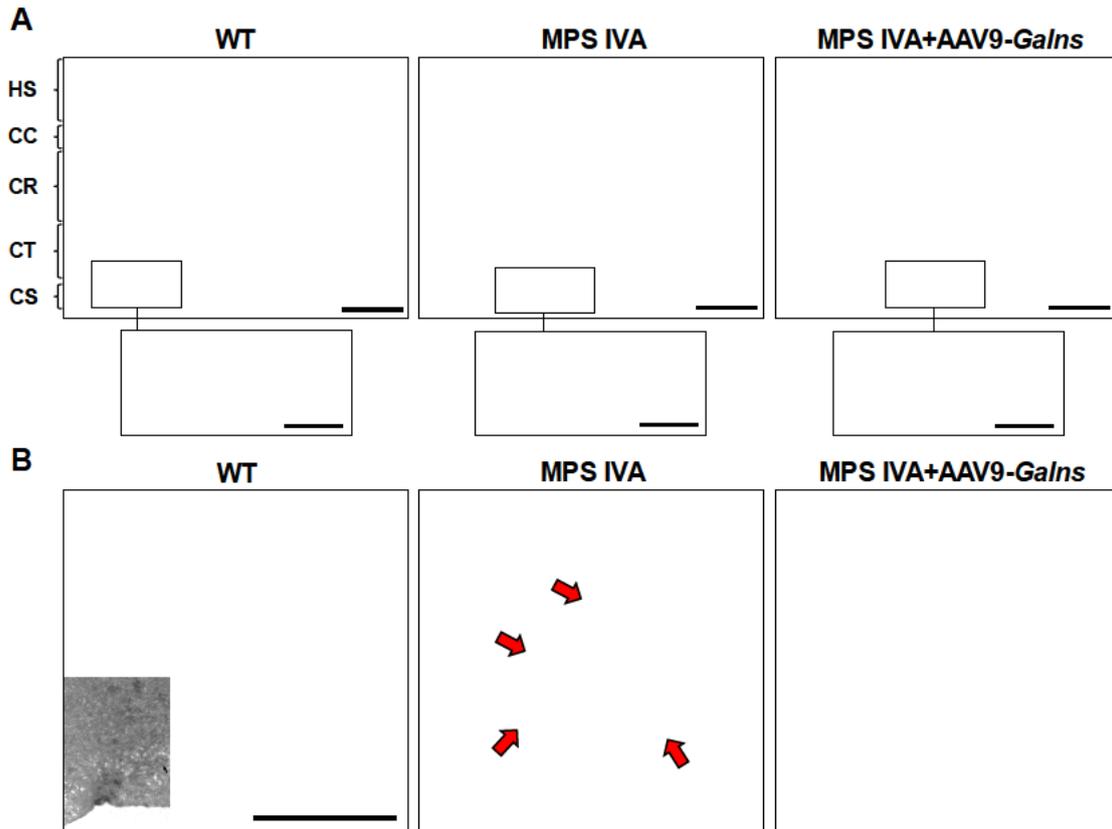


Figura 58. Reducción de la hipertrofia de los condrocitos del cartilago articular. Análisis del cartilago articular de húmero y tibia a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-Galns a las 4 semanas de edad. **(A)** Fotomicrografías representativas de la tinción con *Safranin Orange* de cortes histológicos del húmero. Se detectaron condrocitos hipertrofos anormales en todo el cartilago articular de ratas MPS IVA no tratadas, mientras que se observó una corrección parcial de este fenotipo, especialmente en la CS (inset), en animales tratados con AAV9-Galns. Barras de escala: 50 μ m; insets, 20 μ m. n=3 animales por grupo. **(B)** Análisis ultraestructural de la CS del cartilago articular de la tibia. Se detectaron grandes vacuolas electrolúcidas (flechas rojas) en ratas MPS IVA no tratadas, las cuales fueron ausentes en los condrocitos del cartilago articular de los animales MPS IVA tratados con AAV9-Galns. Barras de escala: 5 μ m. n=2-3 animales por grupo. HS: Hueso subcondral, CC: Capa calcificada, CR: Capa radial, CT: Capa de transición, CS: Capa superficial.

Las ratas MPS IVA presentaron alteraciones de la membrana sinovial a los 6 meses de edad, como hiperplasia de la capa superficial de la membrana sinovial (Figura 28), se decidió analizar histológicamente el efecto del tratamiento con AAV9-Galns sobre este tejido. Para ello, se realizó un análisis de la patología lisosomal de la membrana sinovial por inmunofluorescencia contra el marcador lisosomal LIMP2. Este análisis reveló un aumento de la expresión de LIMP2 en las ratas MPS IVA no tratadas, lo que evidenció signos de distensión lisosomal en las células de la membrana sinovial (Figura 59). En cambio, las ratas MPS IVA tratadas con el vector AAV9-Galns mostraron una corrección de la distensión lisosomal 5 meses después de la administración del vector terapéutico (Figura 59).

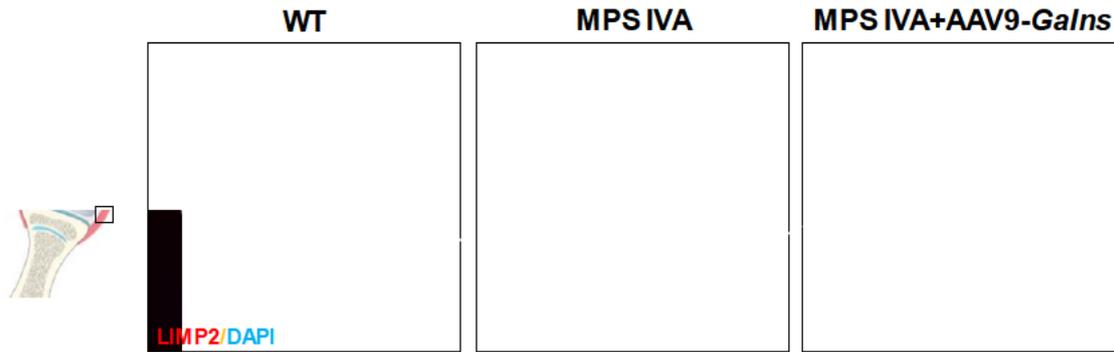


Figura 59. Corrección de la distensión lisosomal de la membrana sinovial. Fotomicrografías representativas de la inmunofluorescencia de LIMP2 en secciones histológicas de la membrana sinovial de ratas WT de 6 meses de edad y ratas MPS IVA no tratadas y tratadas tras 5 meses de la administración intravenosa del vector AAV9-*Galns*. n=3 animales por grupo.

Dada la mejora del estado de las articulaciones en las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns*, se analizó si este efecto se traducía en una mejora a nivel funcional mediante el test de fuerza de agarre (GST: *Grip Strength Test*). La fuerza de agarre se ha utilizado ampliamente como una medida funcional para evaluar la inflamación y el dolor articular (Montilla-García et al. 2017; Dutta et al. 2018), una sintomatología muy frecuente en los pacientes de Morquio A (Shunji Tomatsu et al. 2014). Al realizar el GST en ratas de 2 y 6 meses de edad, se observó que las ratas MPS IVA no tratadas obtenían valores más bajos de fuerza de agarre en comparación con las ratas WT (Figura 60). En cambio, el tratamiento con vectores AAV9-*Galns* resultó en un completo restablecimiento de la fuerza media de agarre en ratas MPS IVA 1 mes y 5 meses después de la administración del vector terapéutico, presentando valores similares a los valores obtenidos en ratas WT (Figura 60).

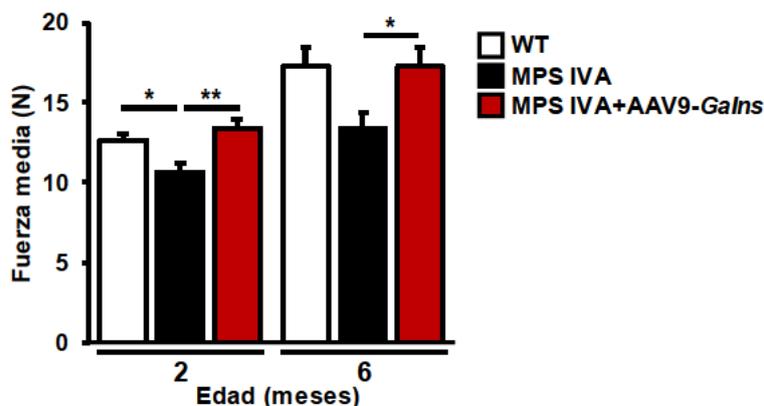


Figura 60. Restauración de la fuerza de agarre. Cuantificación de la fuerza media de agarre por GST en ratas WT y ratas MPS IVA no tratadas y tratadas de 2 y 6 meses de edad (1 mes y 5 meses después de la administración IV del vector AAV9-*Galns* a una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata). El GST reveló una recuperación completa de la fuerza de agarre en ratas MPS IVA tratadas con el vector terapéutico en ambas edades analizadas. Los resultados se muestran como media \pm SEM; n=6-11 animales por grupo. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs ratas MPS IVA sin tratar.

Estos resultados mostraron el efecto terapéutico del vector *AAV9-Galns* administrado por vía intravenosa, con una reducción de KS y una mejoría de las alteraciones patológicas detectadas en las articulaciones de las ratas MPS IVA, que resultaron en una normalización de la fuerza de agarre. En conjunto, esta mejora del fenotipo articular de las ratas MPS IVA tratadas con el vector terapéutico podría contrarrestar los problemas articulares típicos de los pacientes de Morquio A asociados con la osteoartritis.

2.6. Efecto de la administración intravenosa de *AAV9-Galns* en la patología dental de las ratas MPS IVA

Una vez evidenciada la capacidad del vector *AAV9-Galns* para revertir la patología ósea de las ratas MPS IVA, se analizó la eficacia terapéutica de dicho vector a nivel odontológico. En primer lugar, se observó que 1 mes después de la administración IV del vector terapéutico, a nivel morfológico, los dientes de ratas MPS IVA tratadas mostraban un aspecto prácticamente indistinguible a los de las ratas WT, con una gran mejoría tanto a nivel de la preservación de la pigmentación del esmalte como en la maloclusión observada en ratas MPS IVA sin tratar (Figura 61).

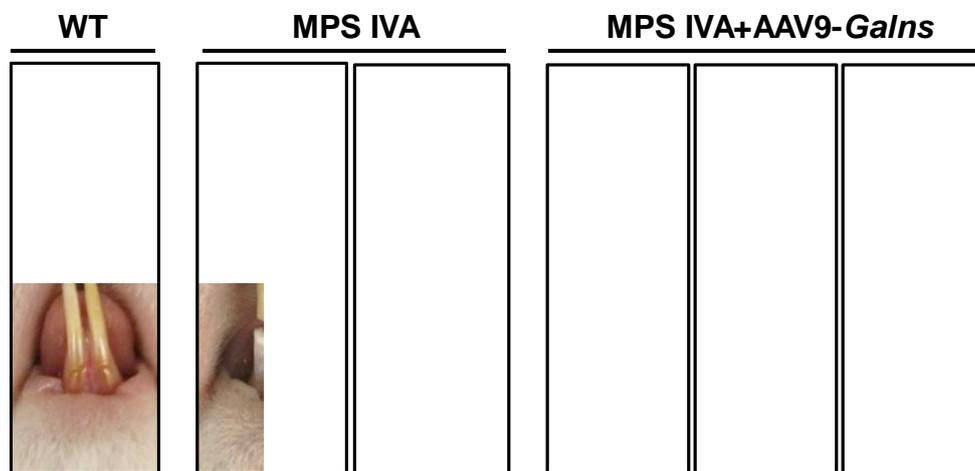


Figura 61. Mejora de las alteraciones dentales tras la administración del vector *AAV9-Galns*. Imágenes representativas de los dientes de ratas WT y ratas MPS IVA sin tratar y tratadas con *AAV9-Galns* 1 mes tras la administración del vector terapéutico. Las ratas WT mostraron normoclusión y normopigmentación de los incisivos. Las ratas MPS IVA mostraron maloclusión y falta de pigmentación en el esmalte. En cambio, la mayoría de las ratas MPS IVA tratadas con *AAV9-Galns* preservaron el esmalte, sin signos de maloclusión.

El esmalte protege los dientes de sustancias externas, como restos alimentarios o bacterias. Las ratas MPS IVA, al presentar una hipoplasia de esmalte, dejaban su epitelio bucal expuesto a estos agentes externos que podrían generar procesos

inflamatorios a nivel mandibular. Por ello, se analizaron a continuación las posibles alteraciones en este tejido a nivel histológico. El 36% de las ratas MPS IVA (4/11) de dos meses de edad presentó granulomas en la fracción ósea del maxilar inferior, como consecuencia de la pérdida del esmalte. Esto generó malformaciones en el hueso mandibular que se evidenciaron mediante análisis histológico de cortes de dicho hueso teñidos con HE (Figura 62). En cambio, ninguna de las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* presentó signos patológicos similares (Figura 62).

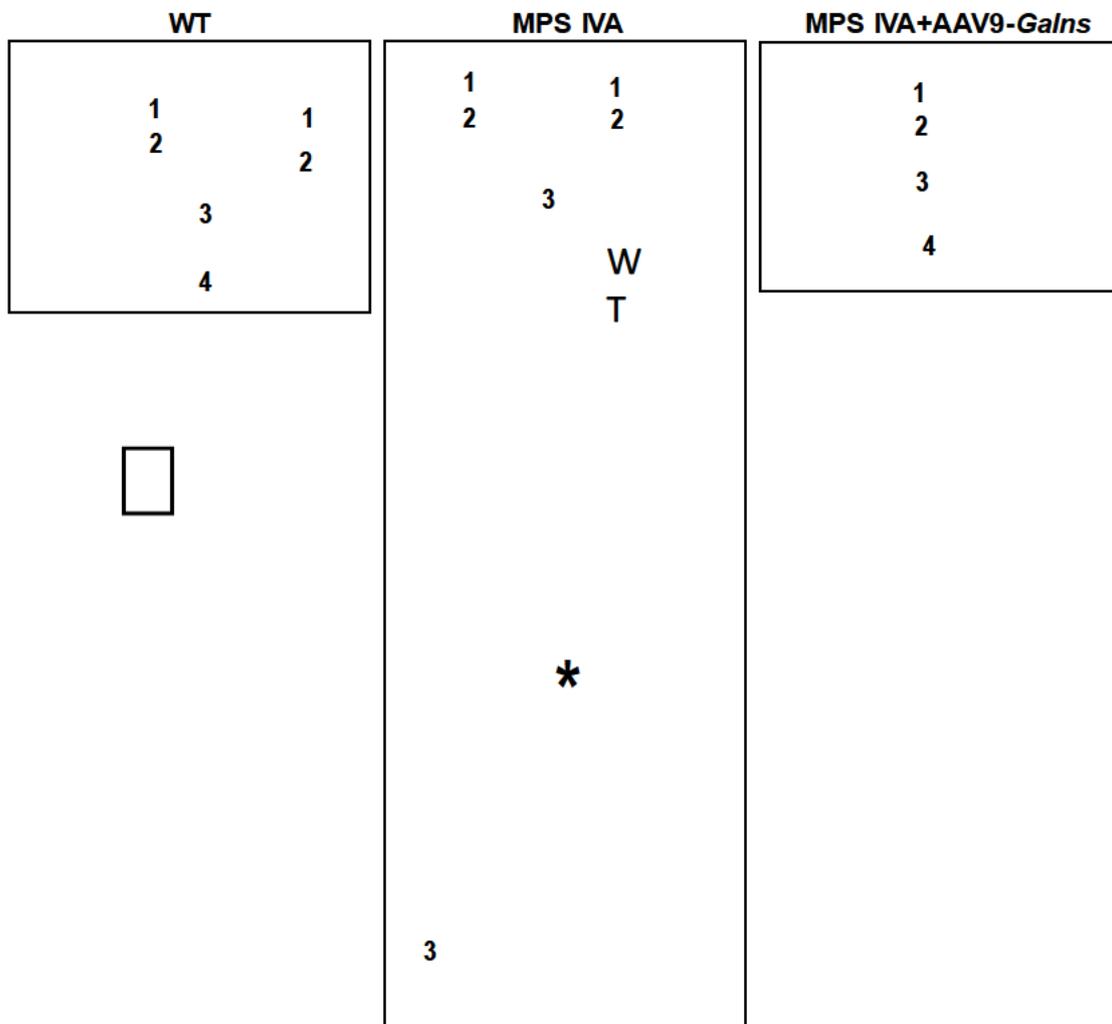


Figura 62. Efecto terapéutico del tratamiento con AAV9-*Galns* en el hueso mandibular. Imágenes representativas de la tinción de HE de secciones de mandíbulas de ratas WT, MPS IVA no tratadas y tratadas con AAV9-*Galns* de 2 meses de edad. Las ratas MPS IVA presentaron granulomas en el hueso mandibular. Este tejido presentó una elevada cantidad de linfocitos y restos alimentarios, generando una alteración ósea secundaria, probablemente debida a la falta de esmalte en los molares. Por otro lado, las ratas MPS IVA tratadas con el vector AAV9-*Galns* no mostraron signos de granulomas a nivel histológico. 1: Diente molar, 2: Alvéolo dentario, 3: Hueso mandibular, 4: Músculo masticatorio, * Granuloma. n=8-11 animales por grupo.

Dado que el esmalte de los incisivos de las ratas tratadas con AAV9-*Galns* se produjo correctamente, se analizó el estado de las células productoras de esmalte, los ameloblastos, mediante análisis ultraestructural por MET. Este estudio evidenció que las ratas MPS IVA no tratadas presentaban un gran número de vesículas de almacenamiento electrolúcido en el citoplasma de ameloblastos. Por el contrario, dichas células mostraron una apariencia similar a la del WT, sin presencia de material poco electrodenso en el citoplasma, tras el tratamiento con el vector terapéutico (Figura 63).

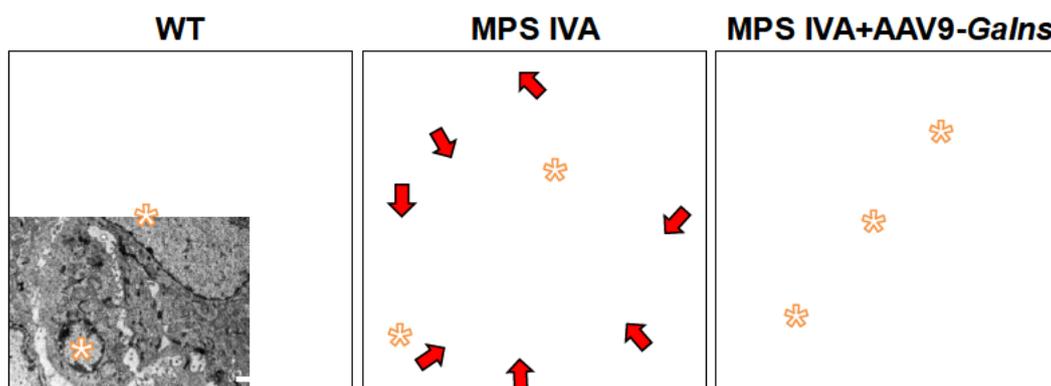


Figura 63. Corrección de la acumulación de material en ameloblastos de incisivos. Análisis ultraestructural de los incisivos en ratas WT de 6 meses de edad y ratas MPS IVA no tratadas y tratadas con AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata. Las vacuolas electrolúcidas (flechas rojas) se detectaron en los ameloblastos (*) de ratas MPS IVA no tratadas, mientras que los ameloblastos de las ratas MPS IVA tratadas mostraron una apariencia similar a la de los animales WT. Barras de escala: 5 μ m. n=2 animales por grupo.

En conjunto, estos resultados evidenciaron la eficacia terapéutica del vector AAV9-*Galns* en corregir las alteraciones dentales de las ratas MPS IVA tras una administración intravenosa.

2.7. Efecto de la administración intravenosa de AAV9-*Galns* sobre el sistema respiratorio

Dada la eficacia terapéutica del vector AAV9-*Galns* para revertir las alteraciones observadas en el cartílago articular, se analizaron los efectos de esta terapia sobre las alteraciones de la tráquea, otro de los tejidos cartilagosos altamente afectados en los pacientes de Morquio A y también en el modelo de rata MPS IVA. El estudio de biodistribución demostró que el vector AAV9 era capaz de transducir la tráquea eficientemente (Figura 38), por ello, se analizó si el vector terapéutico AAV9-*Galns* era capaz de revertir las alteraciones detectadas en las ratas MPS IVA.

Cinco meses después de la administración IV del vector AAV9-*Galns* a ratas MPS IVA, se detectó un aumento significativo en los niveles de mRNA de *orGalns* en la tráquea (Figura 64A). Este aumento en la expresión llevó a un aumento de casi 3 veces la actividad GALNS en la tráquea de las ratas MPS IVA tratadas, en comparación con la actividad enzimática observada en ratas WT (Figura 64B).

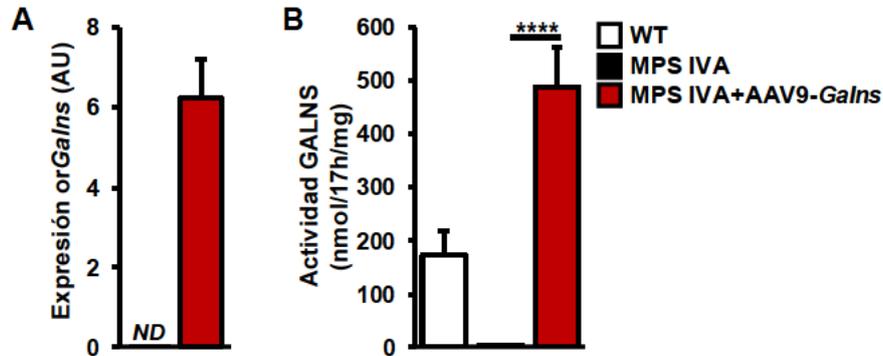


Figura 64. Recuperación de la expresión y actividad GALNS en la tráquea. Análisis de la tráquea a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad. **(A)** Expresión de *orGalns* en la tráquea tras análisis por qPCR. Cinco meses después del tratamiento, los animales tratados mostraron expresión de *orGalns* en la tráquea. WT ($n=2$) y MPS IVA tratadas ($n=7$). **(B)** Cuantificación de la actividad GALNS. Las ratas tratadas con AAV9-*Galns* mostraron niveles superiores a los observados en ratas WT. $n=5-7$ animales por grupo. Los resultados se muestran como media \pm SEM. **** $P < 0,0001$ vs MPS IVA no tratadas. ND: no detectable.

En animales sanos (WT), se observó histológicamente que la mayor parte de los condrocitos traqueales tenían una única gota lipídica grande en el citoplasma. En cambio, los condrocitos de las ratas MPS IVA mostraron un mayor número de gotas lipídicas con un tamaño más pequeño que las gotas observadas en las ratas WT (Figura 65A). Estas alteraciones fenotípicas no se observaron en los condrocitos de ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns*, los cuales presentaron un aspecto similar al observado en los condrocitos de las ratas WT (Figura 65A). Esta corrección en el fenotipo de los condrocitos también se evidenció por MET, en cortes ultrafinos de tráquea de ratas MPS IVA tras 5 meses de tratamiento (Figura 65B). Además, este análisis reveló la presencia de múltiples vesículas pequeñas de almacenamiento electrolúcido en condrocitos de ratas MPS IVA no tratadas, que eran ausentes en las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* (Figura 65B).

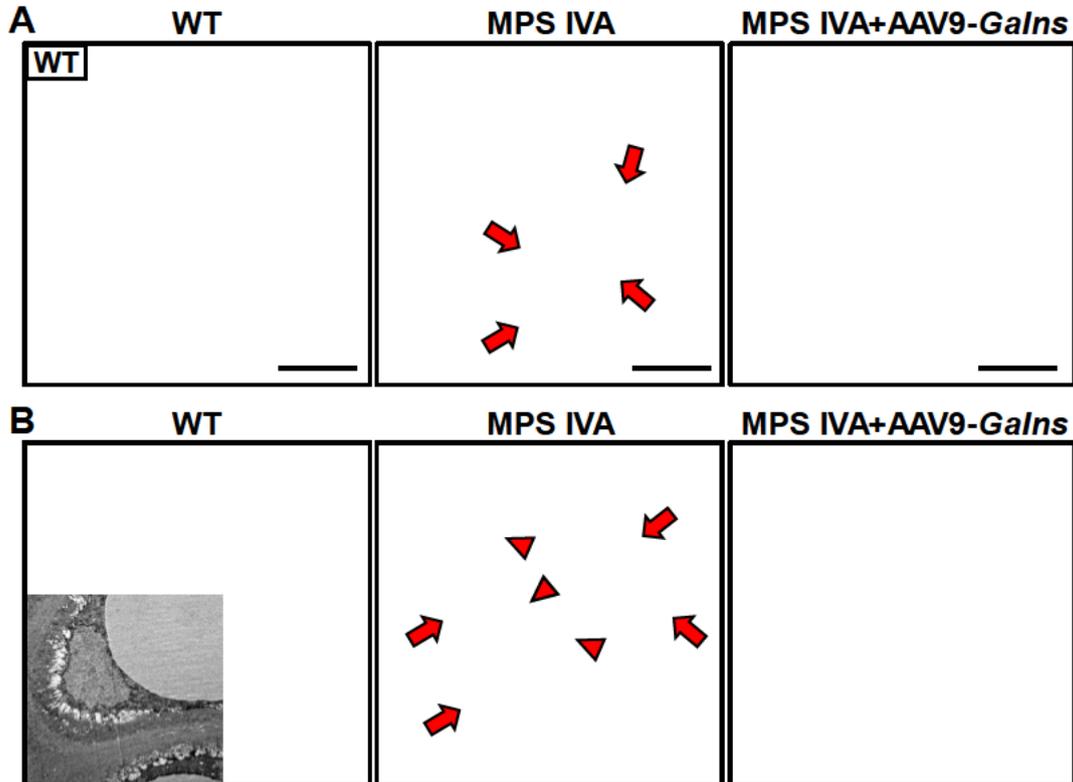


Figura 65. Normalización del almacenamiento vesicular en condrocitos de la tráquea. Análisis de la tráquea a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad. **(A)** Fotomicrografías representativas de la tinción con azul de toluidina de cortes semifinos de la tráquea. Se observaron condrocitos con un elevado número de gotas lipídicas de pequeño tamaño (flechas rojas) en ratas MPS IVA no tratadas. Esta alteración no se observó después del tratamiento con AAV9-*Galns* en ratas MPS IVA. Barra de escala: 20 μm . n=3 animales por grupo. **(B)** Análisis ultraestructural por TEM de la tráquea. Las ratas MPS IVA mostraron material de almacenamiento electrolúcido (puntas de flecha roja) y múltiples vesículas lipídicas (flechas rojas). Estas vesículas no se detectaron en los condrocitos traqueales de las ratas MPS IVA tratadas. Barra de escala: 5 μm . n=2-3 animales por grupo.

Además de las alteraciones en los condrocitos del cartílago traqueal, los pacientes con Morquio A sufren infecciones recurrentes del tracto respiratorio (S. Tomatsu et al. 2011; El Falaki et al. 2014). Como se observó en las ratas MPS IVA, dicho epitelio presentaba alteraciones a nivel de las células ciliadas (Figura 31), por este motivo, se evaluó la eficacia terapéutica del vector AAV9-*Galns* en este tejido. El análisis histopatológico del epitelio respiratorio evidenció una completa corrección de la presencia de material intracelular en las células ciliadas de ratas MPS IVA tratadas, 5 meses después de la administración IV de AAV9-*Galns* (Figura 66A). Este resultado se evidenció mediante análisis ultraestructural, en el que también se observó una completa corrección de la presencia de vesículas de almacenamiento electrolúcido en las células ciliadas del epitelio respiratorio de las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* (Figura 66B). Además, el análisis de MET demostró que la administración del vector terapéutico era capaz de eliminar la acumulación de material poco electrodensito en los fibroblastos

de la lámina propia mucosa traqueal de las ratas MPS IVA (Figura 66C). En conjunto, estos resultados demostraron que el tratamiento con AAV9-*Galns* era capaz de revertir las alteraciones traqueales observadas en las ratas MPS IVA.

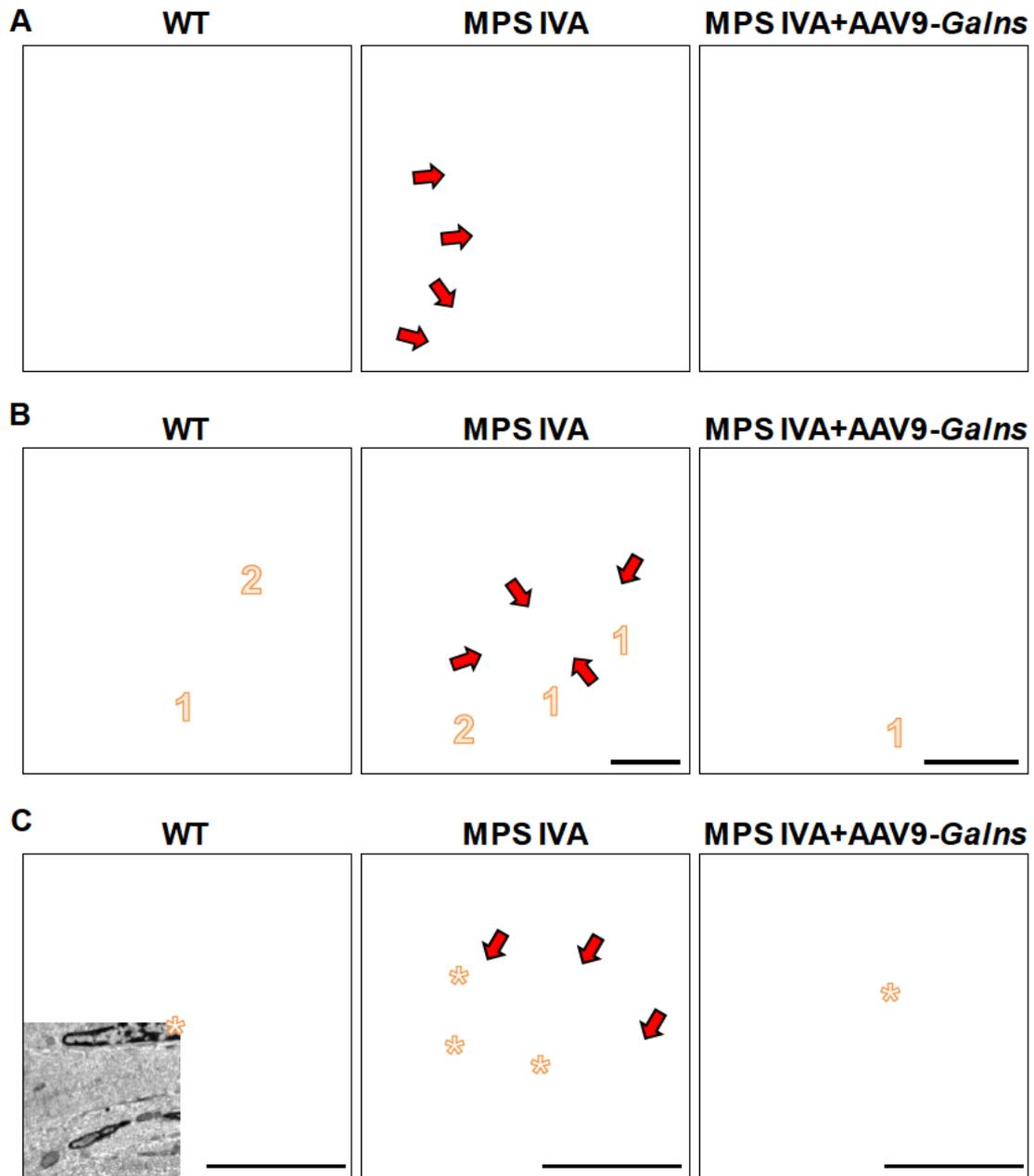


Figura 66. Normalización del almacenamiento intracelular en el epitelio respiratorio de la tráquea. Análisis de la tráquea a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad. (A) Fotomicrografías representativas de la tinción con azul de toluidina de cortes semifinos del epitelio respiratorio. Las ratas MPS IVA no tratadas mostraron una acumulación de materiales de almacenamiento (flechas rojas) en el citoplasma de células ciliadas de la tráquea, que se corrigió completamente en los animales tratados con AAV9-*Galns* 5 meses después del tratamiento. Barra de escala: 10 μ m. (B, C) Análisis ultraestructural por TEM del epitelio respiratorio (B) y de los fibroblastos de la lámina propia mucosa (C) de la tráquea. Las ratas MPS IVA tratadas fueron indistinguibles a los animales WT, dado que no mostraron vesículas electrolúcidas (flechas rojas) ni en células ciliadas (1) ni en fibroblastos (*). Barra de escala: 5 μ m. n=2-3 animales por grupo. 2: células caliciformes.

Una vez evidenciada la capacidad del tratamiento con AAV9-*Galns* para corregir las alteraciones observadas en la tráquea, se evaluó la eficacia de dicho vector para transducir el pulmón, otro de los órganos afectados en la enfermedad de Morquio A (Yasuda et al. 2013). Este análisis evidenció la presencia de expresión de *orGalns* en los pulmones de las ratas tratadas, 5 meses después de la administración IV del vector terapéutico (Figura 67A). El incremento en la expresión de *Galns* se tradujo en un incremento en la actividad GALNS en extractos pulmonares de ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns*, alcanzando valores incluso superiores a los observados en ratas WT (Figura 67B). Dada la normalización de la actividad GALNS en el pulmón, ésta podría ser suficiente para corregir las alteraciones pulmonares del sistema respiratorio inferior.

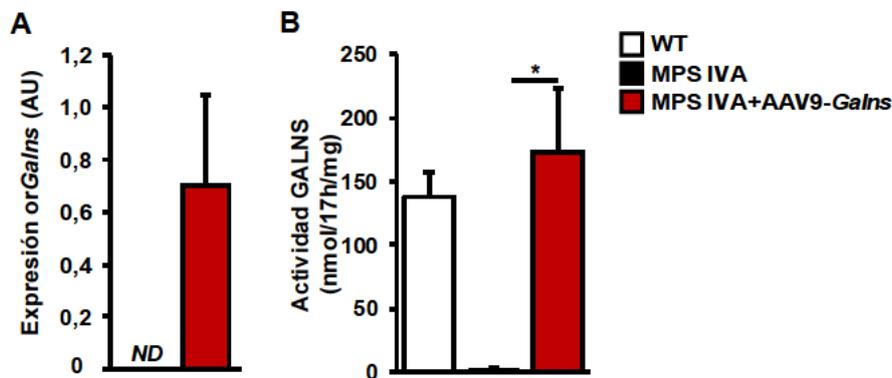


Figura 67. Aumento de la expresión de *orGalns* y de la actividad GALNS en pulmón. Análisis del pulmón a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad. **(A)** Expresión pulmonar de *orGalns* tras análisis por qPCR. WT (n=2) y MPS IVA tratadas (n=7). **(B)** Cuantificación de la actividad GALNS en pulmón. Las ratas tratadas con AAV9-*Galns* mostraron niveles de actividad GALNS cercanos a los observados en ratas WT. n=5-7 animales por grupo. Los resultados se muestran como media \pm SEM. * $P < 0,05$ vs MPS IVA sin tratar. ND: no detectable.

2.8. Efecto de la administración intravenosa de AAV9-*Galns* en la patología cardiovascular de las ratas MPS IVA

Las alteraciones cardiovasculares son uno de los principales problemas en los pacientes con Morquio A (Yasuda et al. 2013). Por ello, se evaluó la capacidad del vector AAV9-*Galns* administrado de forma intravenosa para transducir el corazón. El análisis de expresión de *orGalns* en el corazón mostró niveles de expresión muy elevados en las ratas MPS IVA tratadas, 5 meses después de la administración del vector terapéutico (Figura 68A). Este aumento en la expresión de *orGalns* dio como resultado un aumento de 10 veces la actividad GALNS en ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* en comparación con ratas WT (Figura 68B).

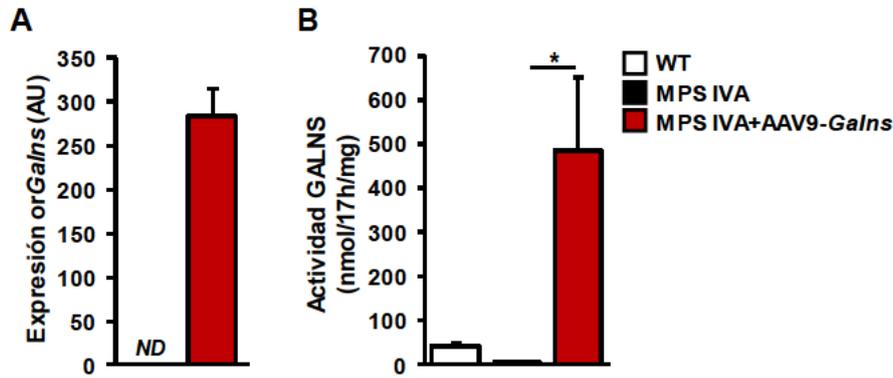


Figura 68. Incremento de la expresión y de la actividad GALNS en el corazón. Análisis del corazón a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-Galns a las 4 semanas de edad. **(A)** Expresión cardíaca de orGalns tras análisis por qPCR. Los animales tratados mostraron elevado aumento en la expresión de orGalns. WT (n=2) y MPS IVA tratadas (n=7). **(B)** Cuantificación de la actividad GALNS en el corazón. El tratamiento con AAV9-Galns permitió alcanzar valores de actividad GALNS 10 veces superiores a los de las ratas WT. n=5-7 animales por grupo. Los resultados se muestran como la media \pm SEM. * $P < 0,05$ vs MPS IVA sin tratar. ND: no detectable.

Dado que las válvulas del corazón son uno de los tejidos cardíacos más afectados en los pacientes de Morquio A, se analizó por MET si el tratamiento era capaz de revertir las alteraciones detectadas en las ratas MPS IVA. El análisis ultraestructural reveló una completa desaparición de las vesículas electrolúcidas observadas en las células subendocárdicas de la válvula mitral de ratas MPS IVA tratadas, 5 meses después de la administración IV del vector AAV9-Galns (Figura 69A). Además, el estudio de MET también evidenció una completa desaparición del material de almacenamiento electrolúcido de las fibras musculares lisas de la aorta de estos animales (Figura 69B).

En pacientes de Morquio A, se ha observado un incremento del ritmo cardíaco de alrededor del 21% respecto a la población sana, debido a las alteraciones cardíacas que presentan estos pacientes (Kampmann et al. 2016). Por ello, se analizó el ritmo cardíaco mediante electrocardiograma (ver Material y Métodos) para determinar si existía un fenotipo cardíaco similar al de los pacientes con Morquio A en las ratas MPS IVA sin tratar, y si el tratamiento con AAV9-Galns era capaz de revertirlo. Este estudio reveló que las ratas MPS IVA sin tratar mostraban un aumento de la frecuencia cardíaca, alteración que quedó totalmente normalizada en ratas MPS IVA tratadas (Figura 70).

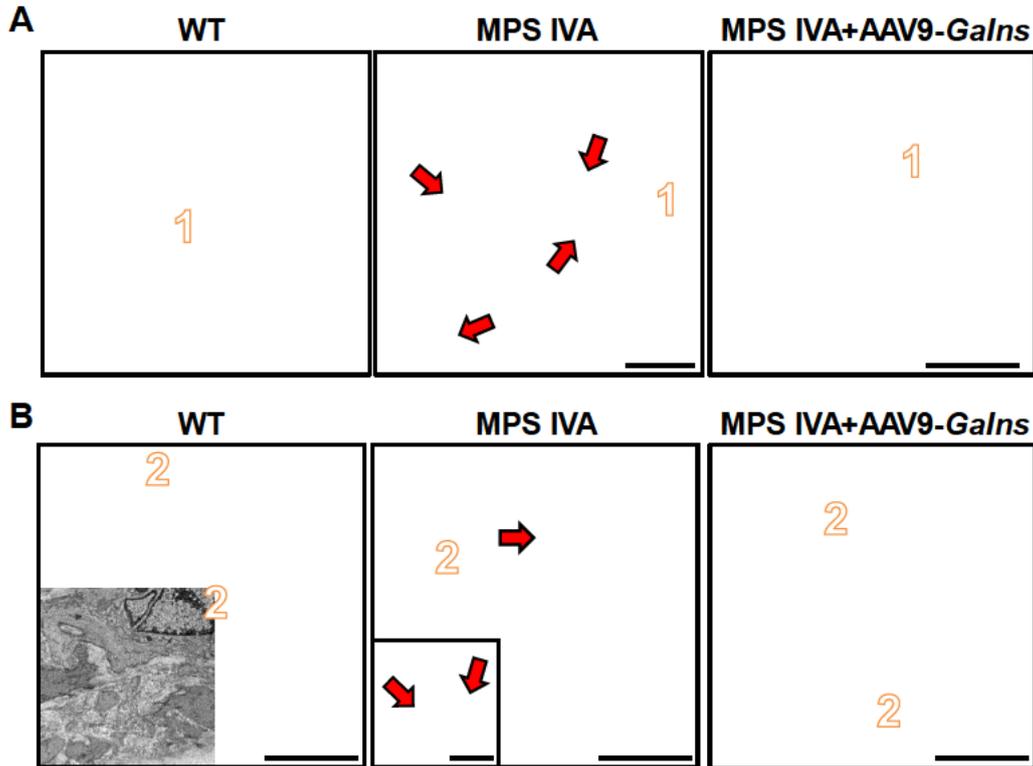


Figura 69. Corrección de la acumulación intracelular en la válvula mitral y la aorta. Análisis ultraestructural del corazón a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-Galns a las 4 semanas de edad. **(A, B)** Imágenes representativas de la válvula mitral (A) y las fibras musculares de la aorta (B). Las ratas tratadas no presentaron signos de acumulación de material poco electrodensso, sino que mostraron un fenotipo similar a las ratas WT. En cambio, las ratas MPS IVA no tratadas presentaron abundantes vesículas electrolúcidas (flechas rojas) en células subendocárdicas de la válvula mitral (1) y en las fibras musculares lisas de la aorta (2). Barras de escala: 10 μ m. n=2-3 animales por grupo.

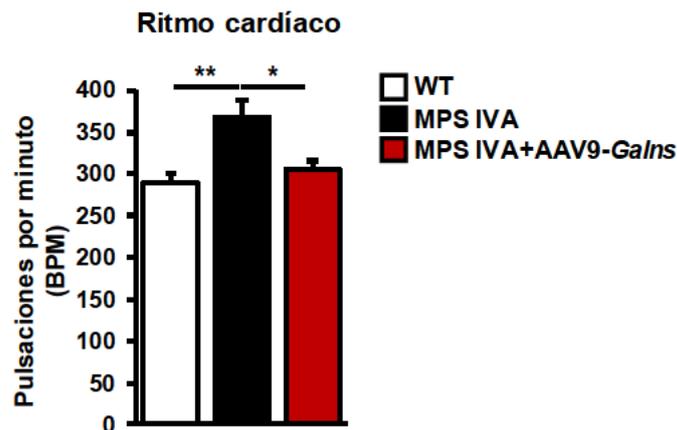


Figura 70. Normalización del ritmo cardíaco en ratas MPS IVA tratadas con AAV9-Galns. Normalización de la frecuencia cardíaca, medida por latidos por minuto (BPM: *Beats Per Minute*), en ratas WT y ratas MPS IVA no tratadas y tratadas, 5 meses después de la administración IV de vectores AAV9-Galns. Los resultados se muestran como la media \pm SEM; n=5-6 animales por grupo. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs MPS IVA sin tratar.

2.9. Efecto de la administración intravenosa de AAV9-Galns en el encéfalo de las ratas MPS IVA

Dadas las alteraciones observadas a nivel del SNC en las ratas MPS IVA, se valoró la capacidad del vector AAV9-Galns para transducir el encéfalo de las ratas MPS IVA tras una administración IV. El análisis de expresión de mRNA reveló un aumento de la expresión de *orGalns* en diferentes secciones del encéfalo de las ratas MPS IVA tratadas, tras 5 meses de la administración del vector terapéutico (Figura 71A). Este aumento en la expresión de *orGalns* indujo un aumento de casi 2 veces la actividad GALNS observada en el encéfalo de ratas WT (Figura 71B). Además, la presencia de actividad GALNS en el encéfalo fue capaz de normalizar la acumulación de KS en el SNC de las ratas MPS IVA (Figura 71C).

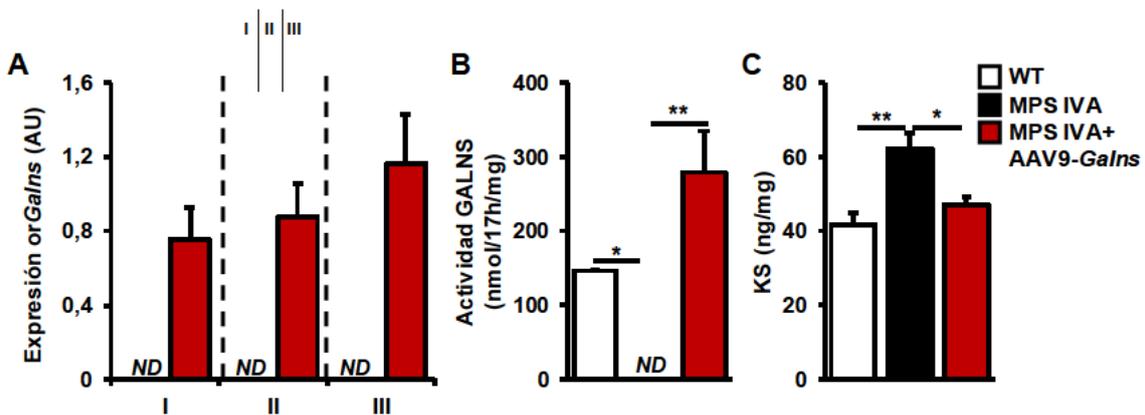


Figura 71. Restauración de la expresión *orGalns* y corrección de la acumulación de KS en el encéfalo. Análisis del encéfalo a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-Galns a las 4 semanas de edad. **(A)** Expresión de *orGalns* en diferentes secciones del encéfalo. WT (n=2) y MPS IVA tratadas (n=7). **(B)** Análisis de la actividad GALNS. n=3 animales por grupo. **(C)** Cuantificación del contenido de KS por LC-MS/MS. La restauración de la actividad GALNS permitió una corrección de la acumulación de KS en el encéfalo. Los resultados se muestran como media \pm SEM. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs MPS IVA sin tratar. ND: no detectable.

Dado que se normalizaron los niveles de KS, se analizó también el encéfalo por TEM para confirmar la desaparición de la acumulación de material poco electrodensito detectado en las ratas MPS IVA no tratadas (Figura 33B). El análisis ultraestructural de la amígdala y del isocórtex en las ratas tratadas con AAV9-Galns confirmó la desaparición de las grandes vesículas de almacenamiento electrolúcidas en células gliales perineuronales detectadas en las ratas MPS IVA no tratadas (Figura 72). Estos resultados indicaron que la administración IV del vector AAV9-Galns fue capaz de corregir la patología de almacenamiento observada en el encéfalo de las ratas MPS IVA.

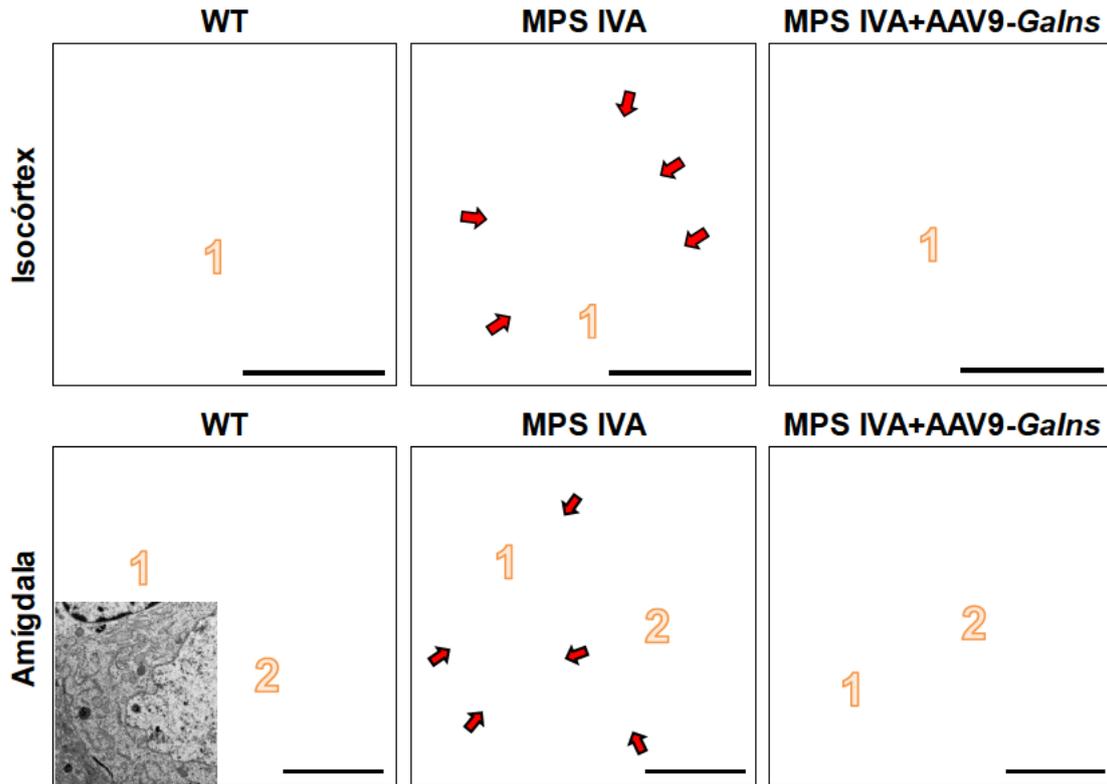


Figura 72. Corrección del almacenamiento de material electrolúcido en cerebro. Análisis ultraestructural del encéfalo a los 6 meses de edad de ratas WT, MPS IVA sin tratar y tratadas con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg del vector AAV9-Galns a las 4 semanas de edad. El análisis por MET evidenció una completa corrección de la presencia de vesículas poco electrodensas (flechas rojas) en células gliales perineuronales del isocórtex y amígdala en las ratas MPS IVA tratadas. No se detectaron acúmulos en las neuronas. Barra de escala: 5 μ m. n=2-3 animales por grupo.

3. ESTUDIO DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE AAV9-GALNS EN RATAS HEMBRA MPS IVA

En la presente tesis doctoral, también se estudiaron las ratas hembra MPS IVA, dado que presentaron un fenotipo patológico muy similar al de los machos. Al igual que las ratas macho MPS IVA, las ratas hembra MPS IVA también acumularon KS en suero de manera progresiva (Figura 73A). Con el objetivo de analizar el potencial terapéutico del vector AAV9-*Galns*, se administró sistémicamente una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata ($6,67 \times 10^{13}$ vg/kg) a ratas hembra MPS IVA de 4 semanas de edad. A los 5 meses de edad, las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* mostraron niveles de actividad GALNS de aproximadamente un 30% respecto a la del WT (Figura 73B). Aunque los valores de actividad GALNS no alcanzaran el nivel de los animales WT, como ocurrió en las ratas macho (Figura 44A), el tratamiento fue capaz de reducir significativamente los niveles de KS de suero e hígado de las ratas hembra MPS IVA a largo plazo, tras 11 meses de la administración del vector AAV9-*Galns* (Figura 73C,D).

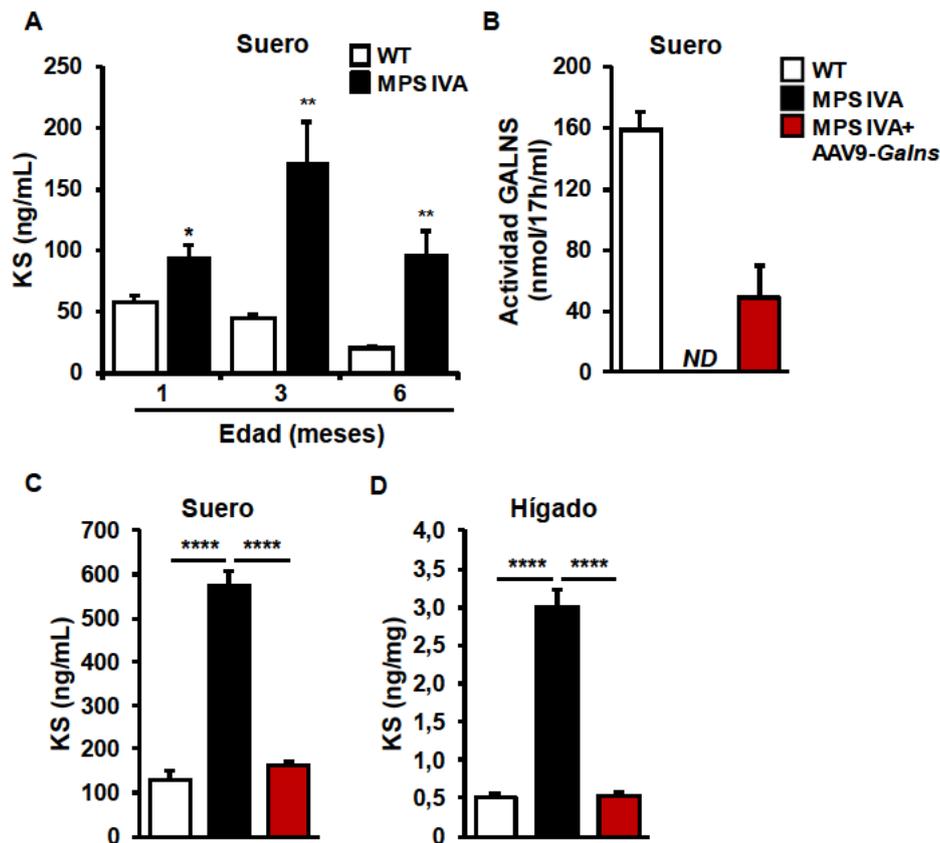


Figura 73. Restauración de la actividad GALNS y corrección de los niveles de KS. (A) Cuantificación del contenido de KS en suero de ratas WT y ratas MPS IVA a 1, 3 y 6 meses de edad. Las ratas MPS IVA no tratadas mostraron un incremento significativo de los niveles de KS en todos los puntos analizados. n=4-5 animales por grupo. (B) Cuantificación de la actividad GALNS circulante de ratas WT y ratas MPS IVA sin tratar y tratadas con AAV9-*Galns* de 5 meses de edad. n=4-8 animales por grupo. (C, D) Cuantificación de los niveles de KS en suero (C) e hígado (D) de ratas WT, MPS IVA no tratadas y tratadas con el vector AAV9-*Galns* de 12 meses de edad. n=3-5 animales por grupo. Los resultados se muestran como media \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y **** $P < 0,0001$ vs ratas MPS IVA no tratadas. ND: no detectable.

Tal como se observó en las ratas macho MPS IVA tratadas, la administración del vector AAV9-*Galns* permitió una normalización del peso corporal y de la longitud naso-anal en las ratas hembra MPS IVA (Figura 74A,B). Además, la administración del vector terapéutico también permitió una mejora en la tasa de supervivencia de las ratas MPS IVA tratadas, en comparación con las no tratadas (Figura 74C).

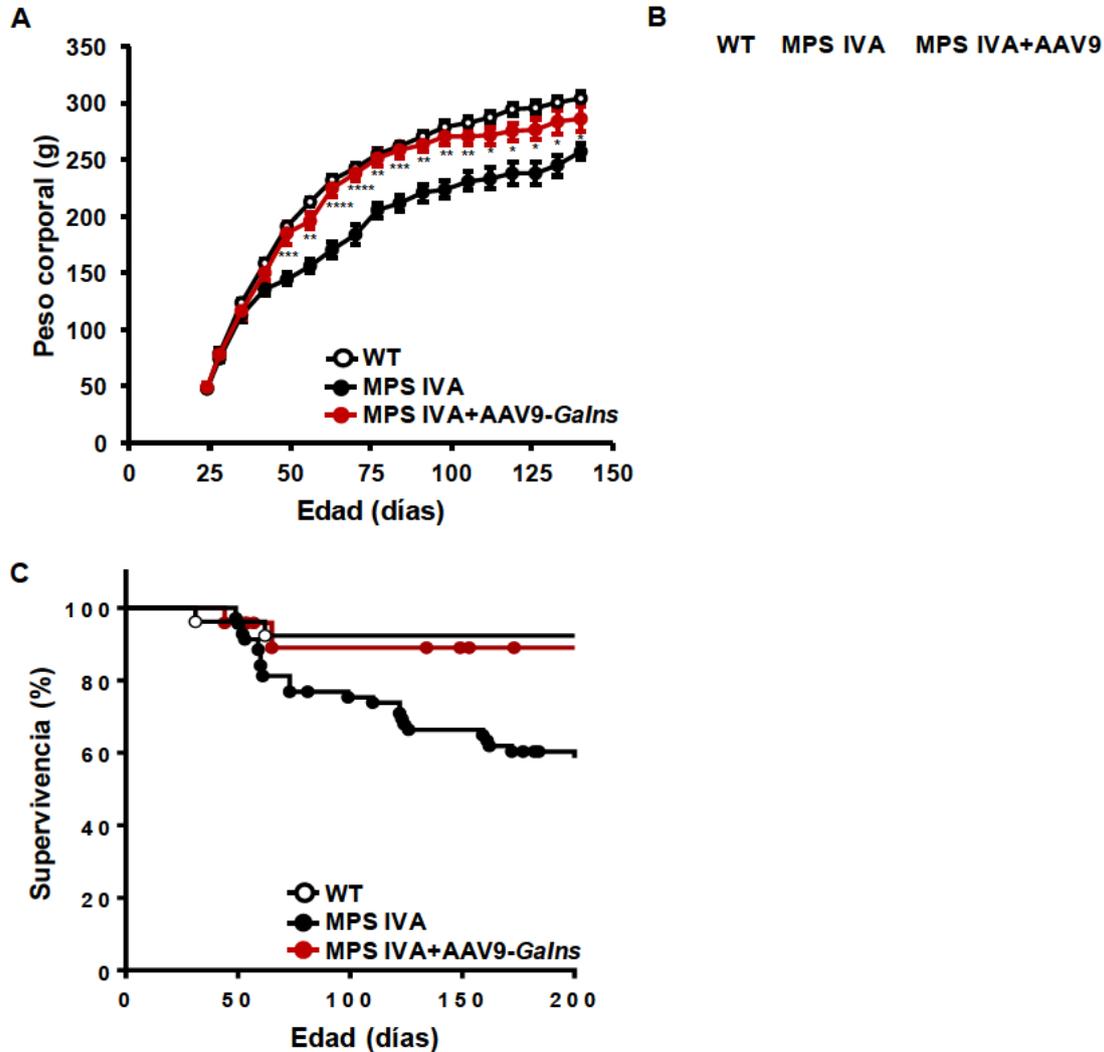


Figura 74. Efecto del tratamiento con AAV9-*Galns* en el tamaño corporal y la supervivencia. (A) Seguimiento del peso corporal en ratas WT (n=32-65), MPS IVA sin tratar (n=16-32) y MPS IVA inyectadas a las 4 semanas de edad con $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata del vector AAV9-*Galns* (n=8-16). Los resultados se muestran como media \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ y **** $P < 0,0001$ vs ratas MPS IVA no tratadas. **(B)** Imagen representativa de ratas WT, MPS IVA no tratadas y tratadas con AAV9-*Galns* de 2 meses de edad. El tratamiento con el vector terapéutico condujo a una normalización completa de la longitud naso-anal (WT: $19,62 \pm 0,22$; MPS IVA no tratado: $16,88 \pm 0,46$; MPS IVA+AAV9-*Galns*: $19,22 \pm 0,31$). n=8-9 animales por grupo. Los resultados se muestran como media \pm SEM. *** $P < 0,001$ vs ratas MPS IVA sin tratar. **(C)** Análisis de supervivencia por Kaplan-Meier en ratas WT (n=26), MPS IVA no tratadas (n=69) y MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* (n=26). A los 6 meses de edad (180 días), las ratas MPS IVA no tratadas mostraron una tasa de supervivencia de aproximadamente el 60%, que fue significativamente menor en comparación con la tasa de supervivencia de los compañeros de camada WT a la misma edad ($P < 0,0001$). Los animales MPS IVA administrados con vectores AAV9-*Galns* mostraron una tasa de supervivencia más larga que las ratas MPS IVA no tratadas, a la edad de 6 meses (5 meses después del tratamiento).

Las ratas hembra MPS IVA tratadas con el vector *AAV9-Galns* también mostraron una recuperación del fenotipo dentario, sin signos de maloclusión, fragilidad dentaria o hipoplasia del esmalte, a diferencia de las ratas MPS IVA no tratadas (Figura 75).

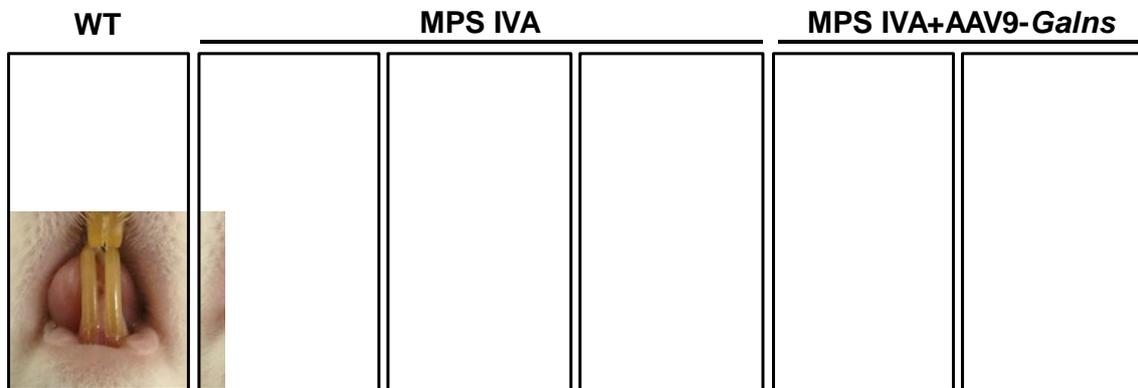


Figura 75. Corrección de las alteraciones dentales. Imágenes representativas de los dientes de ratas de 2 meses de edad WT y ratas MPS IVA sin tratar y tratadas con *AAV9-Galns* a las 4 semanas de edad con una dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata. La preservación del esmalte se observó en ratas MPS IVA 1 mes después del tratamiento, mientras que las ratas MPS IVA mostraron signos de maloclusión, fragilidad dental e hipoplasia del esmalte.

En conjunto, estos resultados demostraron el potencial terapéutico del vector *AAV9-Galns* en corregir también las alteraciones patológicas observadas en las ratas hembra MPS IVA y en mantener los niveles de KS normalizados a largo plazo, de manera similar a lo observado en las ratas macho MPS IVA.

V. Discusión

La MPS IVA es una enfermedad de depósito lisosomal (LSD) causada por la deficiencia de la enzima lisosomal N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa (GALNS), lo que conlleva la acumulación patológica de los glicosaminoglicanos (GAG) Queratán Sulfato (KS) y Condroitín-6-Sulfato (C6S), principalmente en los condrocitos y la matriz extracelular del cartílago. Esto tiene un impacto directo en el desarrollo del cartílago y el hueso, lo que lleva a una displasia esquelética, un deterioro temprano del cartílago y otras complicaciones sistémicas potencialmente mortales (S. Tomatsu et al. 2011; Shunji Tomatsu et al. 2014).

El tratamiento de enfermedades con afectación esquelética, como la MPS IVA, significa un importante desafío debido al inicio temprano de los problemas de crecimiento durante la infancia (S. Tomatsu et al. 2011; Shunji Tomatsu et al. 2014; Shunji Tomatsu, Montaña, et al. 2015) y a la dificultad de las terapias actuales para alcanzar tejidos aislados, como por ejemplo el tejido cartilaginoso avascular (Yangzi and Tuan 2015; Goldberg et al. 2017). Actualmente, no existe ningún tratamiento efectivo para la MPS IVA. El único tratamiento disponible para estos pacientes es el VIMIZIM®, una terapia de reemplazo enzimático que no ha demostrado eficacia terapéutica en la corrección de los problemas de crecimiento, esqueléticos, auditivos, cardíacos ni la opacidad corneal (Christian J Hendriksz et al. 2014; Christian J. Hendriksz et al. 2015; Shunji Tomatsu, Sawamoto, et al. 2015; Shunji Tomatsu, Doherty, and Stapleton 2019; Doherty et al. 2019). Esta falta de eficacia terapéutica y el elevado coste económico de las administraciones periódicas de la ERT (380.000\$/año), hace necesario el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas para tratar la MPS IVA. La terapia génica *in vivo* basada en vectores AAV representa una de las alternativas más prometedoras, ya que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de múltiples enfermedades a largo plazo (Nathwani et al. 2011; Buchlis et al. 2012; Testa et al. 2013; Bainbridge et al. 2015). Por este motivo, el objetivo principal de la presente tesis doctoral fue el desarrollo de una nueva aproximación de terapia génica basada en la administración intravenosa de un vector AAV9 codificante para la enzima GALNS (AAV9-*Galns*) para el tratamiento de la MPS IVA.

El desarrollo de estrategias terapéuticas exitosas depende en gran medida de la disponibilidad de buenos modelos animales que reproduzcan la enfermedad humana. Actualmente, ninguno de los ratones modelo de la MPS IVA descritos desarrollan la patología ósea característica de los pacientes con Morquio A (Shunji Tomatsu et al. 2003; Shunji Tomatsu, Gutierrez, et al. 2005; Shunji Tomatsu, Vogler, et al. 2007). Sin embargo, se ha observado en varias enfermedades hereditarias, como la MPS VI, la distrofia muscular de Duchenne o la enfermedad de Pompe, que la rata modelo de la

enfermedad desarrolla fenotipos más similares a las alteraciones patológicas observadas en pacientes humanos que los observados en los respectivos modelos de ratón (Tessitore et al. 2008; Larcher et al. 2014; Byrne et al. 2019). Con el fin de superar las limitaciones de los ratones modelo de la MPS IVA actuales, el primer objetivo de la presente tesis doctoral fue generar la primera rata modelo *Knock-in* de la MPS IVA introduciendo la mutación *missense* humana más frecuente (c.1156C>T) en el gen *Galns* de la rata mediante la tecnología CRISPR/Cas9. No obstante, varios grupos de investigación han evidenciado que el sistema CRISPR/Cas9 puede generar *off-targets* (Tsai et al. 2017; Wilson et al. 2019). Para demostrar que el fenotipo observado en la rata MPS IVA es sólo causado por la mutación específica introducida, y no por un evento *off-target* inespecífico, se realizaron retrocruces selectivos durante 3 generaciones en dos líneas de ratas MPS IVA independientes (L1 y L2) para segregarlos. El análisis fenotípico de ambas líneas de ratas MPS IVA reveló que dichas ratas presentaban el mismo fenotipo. Por ello, se concluyó que la acumulación de KS y la reducción del tamaño corporal observados en las ratas MPS IVA, como consecuencia de la ausencia de actividad GALNS, era debido únicamente a la introducción de la mutación C>T en el gen *Galns* de la rata.

Una vez se obtuvieron las primeras ratas MPS IVA homocigotas en la cuarta generación, tras la segregación de *off-targets*, se inició un estudio fenotípico de los diferentes órganos y tejidos que se observan alterados en los pacientes de Morquio A. Esta nueva rata modelo de la MPS IVA desarrolló los signos patológicos típicos de la enfermedad, tales como alteraciones en el tamaño corporal (Peracha et al. 2018), reducción de la esperanza de vida (Yasuda et al. 2013), pérdida temprana del cartílago articular (S. Tomatsu et al. 2011; Shunji Tomatsu et al. 2014), hipertrofia de los condrocitos (De Franceschi et al. 2007; Yasuda et al. 2013), alteraciones esqueléticas (S. Tomatsu et al. 2011; Shunji Tomatsu et al. 2014; Peracha et al. 2018), hipoplasia del esmalte (De Santana Sarmiento et al. 2015; Peracha et al. 2018) y acumulación de KS en todos los órganos y tejidos estudiados (Yasuda et al. 2013), como la placa de crecimiento y los tejidos óseos.

En pacientes humanos, los niveles de KS en sangre aumentan progresivamente durante los primeros 5 años de vida, permanecen elevados hasta los 12 años y disminuyen después de la adolescencia hasta que se estabilizan alrededor de los 20 años (Düng et al. 2013). La disminución del nivel de KS después de la adolescencia concuerda con el hecho de que la tasa de crecimiento en niños comienza a disminuir a medida que llegan a la edad adulta. Una reducción del catabolismo de los proteoglicanos en el cartílago adulto y/o la disminución de la porción cartilaginosa se traduciría en una

reducción de la concentración de KS en sangre. Los pacientes jóvenes de Morquio A (entre los 5-15 años) experimentan una pérdida progresiva del cartílago, liberando grandes cantidades de KS en suero, hasta que la placa de crecimiento se cierra y la síntesis de KS en el cartílago disminuye notablemente (Düng et al. 2013). De manera similar a los pacientes de Morquio A, las ratas MPS IVA de 1 mes de edad mostraron niveles de KS que casi doblaban los observados en ratas WT. Estos niveles se incrementaron a los 1,5 meses de edad, a los 3 meses se estabilizaron y a los 6 meses se redujeron ligeramente. Estos resultados sugieren que el aumento progresivo del KS circulante en ratas MPS IVA también podría estar relacionada, en parte, con la tasa del catabolismo del cartílago y el crecimiento óseo. Además, la secreción del exceso de KS por parte de otros tejidos periféricos, como por ejemplo el hígado, también podría colaborar en los elevados niveles de KS detectados en el suero de las ratas MPS IVA.

Durante la infancia, el tejido cartilaginoso de los pacientes de Morquio A sufre alteraciones como resultado de una condrogénesis anormal y/o problemas en la osificación endocondral (S. Tomatsu et al. 2011; Shunji Tomatsu et al. 2014). El análisis de las placas de crecimiento de las ratas MPS IVA evidenció alteraciones en los condrocitos, probablemente debidas a la acumulación patológica de GAG. En humanos, el KS es un componente importante de la placa de crecimiento y su acumulación patológica, principalmente en condrocitos y matriz extracelular de cartílago, tiene un impacto directo en el desarrollo óseo (Shunji Tomatsu et al. 2014). Las ratas MPS IVA acumularon KS en todas las regiones óseas analizadas (epífisis, placa de crecimiento y diáfisis). Además, las ratas MPS IVA también presentaron una alteración de los parámetros de densidad y composición ósea y un acortamiento de los huesos largos, similar a la observada en otros modelos de ratas MPS con afectación ósea, como la rata modelo de la MPS VI (Tessitore et al. 2008). La acumulación patológica de KS, principalmente en los condrocitos hipertrofiados de la placa de crecimiento, podría ser la principal causa de las alteraciones esqueléticas observadas en estos animales, tal y como se da en pacientes de Morquio A (Shunji Tomatsu et al. 2014; Peracha et al. 2018). Alteraciones en la osificación endocondral podrían explicar la reducción del tamaño y de la longitud naso-anal y tibial de las ratas MPS IVA, en comparación con las ratas WT.

Otro GAG que también se encuentra acumulado en los pacientes de Morquio A es el C6S. El Condroitín Sulfato es uno de los principales GAG que forman el cartílago de crecimiento y dependiendo del lugar de sulfatación se diferencia en Condroitín-4-Sulfato (C4S) o Condroitín-6-Sulfato (C6S). Varios estudios sugieren que la concentración de C6S en la placa de crecimiento de la rata es menor a la del C4S, que es el GAG mayoritario (Hagiwara, Aoki, and Yoshimi 1995). En cambio, en humanos, el

C6S representa uno de los principales componentes del cartílago de crecimiento, a niveles similares a los del C4S (Mourão 1988). La cuantificación por LC-MS/MS evidenció una proporción menor de C6S respecto al C4S en la placa de crecimiento del fémur y en la fracción ósea analizada en las ratas WT. Además, no se detectaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de C6S en ninguna de las regiones del fémur analizadas en las ratas MPS IVA. En conjunto, dado que el C6S no se encontró en la misma proporción que en el cartílago humano y dado que no se acumuló significativamente, estos resultados sugieren que dicho GAG probablemente no tenga una implicación tan significativa como el KS en la patología ósea de las ratas MPS IVA.

Además, las ratas MPS IVA mostraron alteraciones en el cartílago articular, una alteración patológica observada en pacientes con Morquio A que genera osteoartritis (OA), la posterior incapacidad de caminar y restricción del movimiento (Shunji Tomatsu et al. 2014; Colmenares-Bonilla and Esquitin-Garduño 2017; Khan et al. 2017). El desgaste del cartílago articular observado en las ratas MPS IVA se desarrolló de manera temprana y progresiva. Esta nueva rata modelo de la MPS IVA no sólo presentó alteraciones en el cartílago articular, sino que también presentó alteraciones de la membrana sinovial, mostrando signos de distensión lisosomal. La disfunción celular de estas células, a causa de la acumulación de GAGs, podría generar una inflamación de la membrana sinovial, una patología que se encuentra correlacionada con la OA (Mathiessen and Conaghan 2017).

En conjunto, la rata modelo de la MPS IVA desarrolló la mayoría de las alteraciones de la enfermedad de Morquio A humana, incluyendo la patología a nivel esquelético. Por ello, puede proporcionar una herramienta útil para el estudio de la fisiopatología de la enfermedad y para testar nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la MPS IVA.

Una complicación común de los tratamientos basados en la introducción de proteínas no propias en el organismo, como la ERT, es la respuesta inmune. El sistema inmunitario puede reconocer estas proteínas recombinantes como exógenas o raras, generando anticuerpos que las neutralicen (Bali et al. 2012; Berrier et al. 2015). La rata *Knock-in* modelo de la MPS IVA generada en la presente tesis doctoral presentó una única mutación de tipo *missense* en el gen *Galns*. En comparación con los modelos *Knock-out*, el modelo *Knock-in* solamente presenta un aminoácido modificado en la proteína GALNS, por lo que el resto de la proteína muy probablemente se podrá traducir con normalidad y ser reconocida por el sistema inmune como proteína endógena. Esto

podría evitar el rechazo de la proteína WT cuando es administrada de manera exógena por ERT o expresada por terapia génica, por lo que el efecto terapéutico del tratamiento no se vería disminuido por la respuesta inmune contra la proteína terapéutica.

La administración intravenosa de vectores AAV se ha descrito previamente en varios modelos animales para el tratamiento de enfermedades genéticas raras (Duque et al. 2009; Fu et al. 2011; Chen et al. 2015). Sin embargo, en la mayoría de las aproximaciones terapéuticas se busca transducir sobre todo el hígado o el SNC. En la bibliografía, no se ha descrito si estos vectores tienen también la capacidad de transducir y expresar genes terapéuticos en el tejido óseo. Por ello, otro objetivo de la presente tesis doctoral fue estudiar la biodistribución del vector AAV9-GFP en el sistema esquelético y otros tejidos afectados en la enfermedad de Morquio A. Tras la administración intravenosa de dicho vector, se evidenció que el vector AAV9 mostraba tropismo por el sistema esquelético. En las regiones del hueso donde se detectó una eficiente transducción, se encontraban áreas ricas en osteoblastos (Forriol and Shapiro 2005; Morrison and Scadden 2014). Estas células se encargan de producir matriz ósea y terminan por diferenciarse en osteocitos, una vez que están rodeadas por dicha matriz. Los osteocitos son células de mantenimiento óseo de vida larga, por lo que su transducción es importante en las enfermedades óseas, ya que podrían permitir la expresión del transgén terapéutico a largo plazo (Roca and Castañeda 2005). Este estudio de biodistribución del vector AAV9-GFP también demostró la eficacia de dicho vector para transducir eficientemente otros tejidos afectados en la enfermedad de Morquio A, como los dientes, órganos periféricos y el encéfalo. Por tanto, dada la extensa y eficiente biodistribución del vector AAV9, se decidió utilizar este serotipo de AAV para desarrollar una aproximación de terapia génica para el tratamiento de la MPS IVA en las ratas modelo de la enfermedad.

El tratamiento temprano de los pacientes es un aspecto esencial para lograr un efecto terapéutico en aquellas enfermedades con afectación en el crecimiento y en el desarrollo óseo. Además, un estudio realizado en ratones MPS IVA sugirió que la administración temprana de la enzima GALNS por vía intravenosa podría facilitar el acceso a la matriz cartilaginosa de manera más eficiente, debido a que ésta podría ser más accesible dada la mayor presencia de vasos sanguíneos cercanos durante las primeras etapas de crecimiento (Shunji Tomatsu, Montão, et al. 2010; Shunji Tomatsu, Sawamoto, et al. 2015). Por ello, las ratas MPS IVA se trataron con el vector AAV9-*Galns* a las 4 semanas de edad, una edad comparable a la de un niño diagnosticado a los pocos años de vida (Barrow 2007). Las ratas MPS IVA presentaron una rápida progresión de la enfermedad, por lo que el tratamiento temprano era importante para

evitar alteraciones irreparables. Inicialmente, las ratas MPS IVA presentaron un peso corporal similar al de las ratas WT, tal y como se ha observado en pacientes de Morquio A, los cuales presentan al nacer un peso indistinguible del de un recién nacido sano (Adriana M. Montaña et al. 2008). A medida que los pacientes crecen, estos presentan una tasa de crecimiento reducida en comparación con los niños sanos de la misma edad, a causa de alteraciones en la osificación endocondral (S. Tomatsu et al. 2011; Shunji Tomatsu et al. 2014). Las ratas MPS IVA presentaron una reducción muy importante del tamaño corporal, con valores de peso y longitud muy inferiores a los de las ratas WT durante todo el seguimiento del estudio. Sin embargo, el tratamiento con AAV9-*Galns* evitó dicha reducción del peso corporal. Los valores de peso de las ratas tratadas se mantuvieron a niveles cercanos a los de las ratas WT a todas las edades analizadas, evidenciando el efecto terapéutico de AAV9-*Galns* sobre la pérdida de peso corporal. De manera similar a los resultados de peso corporal obtenidos, las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* también mostraron valores de longitud naso-anal indistinguibles de aquellos detectados en ratas WT. Estos resultados sugirieron un efecto terapéutico del vector AAV9-*Galns* sobre el tamaño corporal de las ratas MPS IVA, tanto en machos como en hembras.

Dado que los vectores AAV no son integrativos, uno de los inconvenientes del tratamiento temprano es que probablemente se diluirá la expresión del transgén en la célula transducida a causa de la alta tasa de replicación de algunos tejidos en edad de crecimiento, como por ejemplo el hígado. Por ello, es necesaria la administración de dosis elevadas de vectores AAV para garantizar la expresión del producto terapéutico a largo plazo. En el caso de las ratas MPS IVA, se administró una única dosis de $3,7 \times 10^{12}$ vg/rata (aproximadamente $6,67 \times 10^{13}$ vg/kg). Dicha dosis ha sido probada previamente en ensayos preclínicos (Tessitore et al. 2008) y clínicos (Mendell et al. 2017) de terapia génica basada en la administración IV de vectores AAV sin mostrar efectos adversos relacionados con el vector terapéutico. Dos semanas tras la administración, se detectó una reducción de la actividad GALNS circulante en los animales tratados con AAV9-*Galns*, probablemente debido a que la expresión del transgén se diluyó dada la elevada tasa de crecimiento de las ratas jóvenes. No obstante, dicha actividad GALNS circulante se mantuvo a niveles estables a lo largo del estudio, alcanzando valores indistinguibles a los medidos en animales WT. Por lo tanto, una sola administración de AAV9-*Galns* a dosis similares a las ya testadas, como por ejemplo la dosis baja testada en ensayos clínicos de terapia génica para la atrofia muscular espinal 1 (SMA1: *Spinal muscular atrophy 1*) (Mendell et al. 2017), permitió mantener el tamaño corporal y mejorar la tasa de supervivencia de las ratas MPS IVA.

La administración intravenosa del vector AAV9 posibilita una elevada transducción del hígado (Sands 2011). Este órgano tiene un gran potencial secretor y aporta una importante cantidad de proteínas al riego sanguíneo, entre ellas enzimas lisosomales. Como se esperaba, en las ratas tratadas con AAV9-*Galns* se detectó una elevada actividad GALNS en el hígado, que fue capaz de reducir los niveles patológicos de KS en dicho órgano y la distensión lisosomal detectada en las células de Kupffer. Por ello, el mantenimiento de actividad GALNS circulante probablemente fue debida a la secreción continuada de dicha enzima por parte del hígado.

Sin embargo, cuando los AAV se administran de forma IV dan lugar a distintos niveles de transducción hepática en función del sexo (Davidoff et al. 2003; Ruzo, Marcó, et al. 2012). Esto se pudo observar en las ratas hembra MPS IVA tratadas con el vector terapéutico, las cuales mostraron niveles de actividad GALNS circulante de aproximadamente un 30% respecto a la del WT. Aun así, estos niveles de actividad fueron suficientes para normalizar los niveles de KS en suero e hígado a largo plazo. Esto correlacionó con lo observado en otros estudios, donde un 10-40% de la actividad enzimática circulante ya era capaz de reducir el acúmulo lisosomal (Cheng and Smith 2003; D. P. W. Rastall and Amalfitano 2017).

El hígado no es el único tejido que podría aportar GALNS al riego sanguíneo. Dado que el promotor ubicuo CAG permite una elevada expresión de *Galns* en todos los tejidos transducidos, otro tejido que podría contribuir a la secreción de GALNS circulante podría ser el tejido adiposo, el cual tiene un gran potencial secretor (Jimenez et al. 2013). La administración del vector AAV9 por vía intravenosa posibilitó una elevada transducción del tejido adiposo de las ratas MPS IVA tratadas, al igual que ocurre en ratones (Jimenez et al. 2013). Los elevados niveles de actividad GALNS en hígado y tejido adiposo probablemente contribuyeron en la reversión y el mantenimiento de los niveles de KS normalizados a largo plazo, hasta los 12 meses de edad, tanto en ratas MPS IVA macho como en hembra. La secreción continuada de GALNS circulante, por parte del hígado y del tejido adiposo, también podría permitir la corrección cruzada de la patología lisosomal en otros tejidos periféricos no transducidos (Tessitore et al. 2008; Ruzo, Marcó, et al. 2012; Ruzo, García, et al. 2012).

En un estudio preclínico se modificó la enzima GALNS con una secuencia de hexaglutamato (E6) para incrementar su vida media y su captación en el hueso (E6-GALNS). Los resultados demostraron que esta enzima se mantenía más tiempo en circulación, aumentando en más de 20 veces su vida media, y permitió una mayor reducción del material acumulado en la placa de crecimiento en comparación con la

enzima no modificada (Shunji Tomatsu, Montão, et al. 2010). Esto sugirió que el hecho de mantener la enzima GALNS más tiempo en circulación permitía que la enzima alcanzase el cartílago de crecimiento y fuera captada por los condrocitos de una manera más eficiente (Shunji Tomatsu, Montão, et al. 2010). En pacientes, la ERT no fue capaz de normalizar el crecimiento anormal o lograr una eficacia terapéutica generalizada, probablemente por la corta vida media de la GALNS recombinante no modificada en circulación (35,9 min) (Sanford and Lo 2014). En cambio, el tratamiento con AAV9-*Galns* sí que permitió una secreción continua de GALNS, lo que también conllevó a una mejoría de las alteraciones patológicas observadas en las placas de crecimiento de ratas MPS IVA. Pese a que el estudio de biodistribución con AAV9-GFP demostró que dicho vector no era capaz de transducir los condrocitos de la placa de crecimiento, el vector sí era capaz de transducir las células adyacentes a la placa de crecimiento. Estas células podrían secretar la enzima GALNS al medio extracelular e incrementar la presencia de GALNS en las áreas adyacentes al cartílago.

La extensa transducción del fémur y de la tibia se tradujo en una eficiente expresión de *Galns* en el hueso tras la administración del vector terapéutico. Este resultado sugirió que la expresión de *orGalns* se mantuvo en el hueso durante las primeras etapas de crecimiento, lo cual podría indicar que los osteoblastos transducidos se diferenciaron en osteocitos y podrían ser, en parte, los responsables de la expresión de *orGalns* a largo plazo. Probablemente, la enzima GALNS secretada podría ser captada por los condrocitos de la zona de reposo, la más cercana a la circulación, lo que explicaría la reducción del número de condrocitos hipertróficos detectados en dicha zona y la reducción de los niveles de KS en la placa de crecimiento de las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns*. Además, el tratamiento con AAV9-*Galns* llevó a una mejora del fenotipo observado en la placa de crecimiento de las ratas MPS IVA sin tratar, reduciendo el número de vesículas de material poco electrodensito acumulado en los condrocitos.

Una mejora en la osificación endocondral podría conducir a una mejoría del crecimiento longitudinal del hueso y de la patología ósea observada en las ratas MPS IVA no tratadas. El tratamiento con AAV9-*Galns* revirtió la acumulación de KS en la diáfisis del fémur y de la tibia, además de la longitud tibial. Al analizar el tejido óseo trabecular y compacto de las ratas tratadas, se detectaron valores de composición, densidad y estructura ósea indistinguibles de los observados en ratas WT, tanto en el fémur como en la tibia. En conjunto, estos resultados demostraron por primera vez que el tratamiento con AAV9-*Galns* es capaz de revertir las alteraciones óseas en un nuevo modelo de la MPS IVA.

Los problemas articulares, causados principalmente por alteraciones en el cartílago articular, son otra característica común que sufren los pacientes de Morquio A. La pérdida temprana del cartílago articular acaba generando osteoartritis (OA) y dolor articular en estos pacientes (Shunji Tomatsu et al. 2014). Actualmente, existen varios estudios basados en la administración intra-articular de vectores AAV para el tratamiento de la OA, los cuales demostraron que estos vectores eran capaces de transducir los condrocitos del cartílago articular (Evans, Ghivizzani, and Robbins 2018; Watson Levings et al. 2018). Sin embargo, el estudio de biodistribución llevado a cabo en la presente tesis doctoral, demostró que el vector AAV9-GFP también era capaz de alcanzar las células del cartílago articular tras una administración intravenosa. Esta capa de cartílago se nutre gracias al líquido sinovial, que es secretado por la membrana sinovial. Dado que el líquido sinovial contiene proteínas derivadas del plasma y proteínas que son producidas por las células internas de la cápsula sinovial (Bennike et al. 2014), estos resultados sugieren que la enzima GALNS podría llegar a ser filtrada de la sangre o también secretada por las células transducidas por el AAV9-*Galns* dentro de la cápsula articular. Esto posibilitaría el transporte de la enzima GALNS del líquido sinovial a los condrocitos del cartílago articular por difusión (Hara, Urban, and Maroudas 1990; Evans, Ghivizzani, and Robbins 2018) y podría explicar el efecto terapéutico del vector AAV9-*Galns* administrado por vía intravenosa observado en dicho tejido. El tratamiento generó una reducción de KS y una mejoría de las alteraciones patológicas detectadas en las articulaciones de las ratas MPS IVA, como una reducción del número de condrocitos hipertróficos en la capa superficial del cartílago articular y la distensión lisosomal detectada en la membrana sinovial. Además, esta mejora del fenotipo articular detectada en las ratas MPS IVA tratadas con AAV9-*Galns* se tradujo en una normalización de la fuerza de agarre. En conjunto, estos resultados sugirieron que el tratamiento con el vector terapéutico puede reducir los problemas articulares asociados con la osteoartritis característica de los pacientes de Morquio A.

Otra característica típica de la enfermedad de Morquio A son las anomalías dentales, como la hipoplasia de esmalte, la maloclusión y la fragilidad dental (S. Tomatsu et al. 2011; De Santana Sarmiento et al. 2015). Estas alteraciones pueden estar causadas por un mal funcionamiento de odontoblastos y ameloblastos (Lustmann 1978; Yamakoshi et al. 2002). Los odontoblastos son las células encargadas de llevar a cabo la dentinogénesis, es decir, la producción de dentina y la correcta formación del diente. Por otro lado, los ameloblastos se encargan de generar y organizar el esmalte que refuerza y protege los dientes. En ratas, los ameloblastos son siempre funcionales, dada la dentición de crecimiento continuo que tienen los roedores. En cambio, en humanos,

los ameloblastos involucionan tras completar la formación del esmalte y desaparecen durante la erupción dentaria por apoptosis. El estudio de biodistribución demostró que el vector AAV9-GFP, administrado por vía intravenosa en ratas, era capaz de transducir eficientemente estas estructuras dentales, incluyendo odontoblastos y las áreas adyacentes a los ameloblastos. Además, también se demostró que, a nivel preclínico, una única administración intravenosa del vector AAV9-*Galns* era capaz de preservar la correcta formación del esmalte y corregía las alteraciones observadas en las ratas MPS IVA no tratadas, como la aparición de granulomas. Dadas las diferencias en el desarrollo de los dientes entre roedores y humanos, el tratamiento con AAV9-*Galns* a nivel clínico debería realizarse durante los primeros años de vida de los pacientes de Morquio A. En este momento es cuando los ameloblastos aún son funcionales en humanos y se podrían mineralizar y desarrollar correctamente los dientes permanentes que duraran toda la vida del paciente, formando un buen esmalte que evitase la fragilidad dental y las frecuentes caries.

La tráquea es otro de los tejidos cartilaginosos afectados, tanto en los pacientes de MPS IVA como en la rata modelo de la enfermedad. La recuperación de la actividad GALNS en la tráquea tras la administración IV del vector AAV9-*Galns* fue suficiente para corregir las alteraciones detectadas en las ratas MPS IVA no tratadas. Además, los pacientes de Morquio A también sufren infecciones recurrentes en el tracto respiratorio superior e inferior (S. Tomatsu et al. 2011; El Falaki et al. 2014). Las ratas MPS IVA no tratadas presentaron alteraciones en las células ciliadas del epitelio respiratorio de la tráquea. Dichas células están implicadas en la limpieza de las vías respiratorias, mediante el movimiento continuo de la mucosidad. Un mal funcionamiento de estas células podría facilitar la colonización de bacterias debido a alteraciones en el movimiento del moco y, por lo tanto, generar infecciones recurrentes en el tracto respiratorio de los pacientes de MPS IVA. Esto también se ha observado en los pacientes de Fibrosis Quística, donde el moco es tan espeso que las células ciliadas no son capaces de moverlo. De esta manera, se acaba convirtiendo en un nicho ideal para el crecimiento de bacterias que provocan las infecciones de las vías respiratorias (Ratjen and Döring 2003). Además, también se detectaron alteraciones en los fibroblastos de la lámina propia mucosa de la tráquea de las ratas MPS IVA. Esta capa de tejido conectivo forma parte de las membranas mucosas del tracto respiratorio y tiene un importante papel estructural e inmunológico evitando la entrada de microbios. Por ello, alteraciones en esta capa también aumentarían el riesgo de sufrir infecciones. El tratamiento con AAV9-*Galns* podría evitar dichas infecciones en las vías respiratorias ya que fue capaz

de eliminar la presencia de acúmulos, tanto en células ciliadas como en los fibroblastos de la tráquea (S. Tomatsu et al. 2011; El Falaki et al. 2014).

Los problemas cardíacos característicos de la MPS IVA pueden poner en riesgo la vida de los pacientes. La deposición de material de almacenamiento dentro de las válvulas cardíacas y las arterias coronarias puede generar una enfermedad valvular cardíaca que, sumada al hecho de presentar una capacidad pulmonar menor, contribuirá a restringir la función respiratoria y a limitar la actividad física (Yasuda et al. 2013; Kampmann et al. 2016). Además, estos pacientes presentan un incremento del ritmo cardíaco del 21% respecto a la población sana, debido probablemente a las alteraciones cardíacas que sufren (Kampmann et al. 2016). La rata modelo de la MPS IVA también acumuló material electrolúcido tanto en la válvula mitral como en la aorta. Además, presentó un incremento del ritmo cardíaco respecto a las ratas WT de la misma edad, evidenciando un fenotipo similar al del humano. El tratamiento con el vector AAV9-*Galns* transdujo con gran eficiencia el corazón, alcanzando unos elevados niveles de expresión y actividad GALNS, los cuales eran capaces de eliminar los acúmulos observados tanto en la válvula mitral como en la aorta. Además, el tratamiento con el vector terapéutico era capaz de normalizar el ritmo cardíaco de las ratas MPS IVA.

En cuanto al sistema nervioso central (SNC), el análisis por LC-MS/MS evidenció una acumulación de KS en el cerebro de las ratas MPS IVA. En los ratones modelo de la MPS IVA ya se detectó material acumulado en distintas regiones del cerebro, sugiriendo una posible patología a nivel central (Shunji Tomatsu et al. 2003; Shunji Tomatsu, Gutierrez, et al. 2005; Shunji Tomatsu, Vogler, et al. 2007). Aunque el Síndrome de Morquio A sea considerado una MPS sin afectación a nivel del SNC, varios estudios han encontrado alteraciones a nivel de la corteza cerebral y de la amígdala (Koto et al. 1978; Davison et al. 2013). Alteraciones a nivel de la amígdala podrían explicar los problemas neurocognitivos que se han evidenciado en estudios recientes en pacientes de Morquio A (Spurlock et al. 2019), dado que este ganglio basal del cerebro está altamente involucrado en las respuestas emocionales y en los comportamientos sociales (Davison et al. 2013). En conjunto, alteraciones en estas zonas del SNC podrían favorecer, en parte, la mayor incidencia de estos pacientes a sufrir alteraciones del comportamiento, como ansiedad, desinhibición o falta de atención (Davison et al. 2013). El análisis histopatológico del encéfalo de ratas MPS IVA evidenció la presencia de vacuolas electrolúcidas con aspecto de lisosomas cargados con GAGs en el citoplasma de células gliales perineuronales que están yuxtapuestas a las neuronas de la corteza cerebral y de la amígdala. La disfunción y muerte celular de estas células gliales podría generar una alteración en el SNC, como la neuroinflamación,

a causa del acúmulo de KS intracelular y en la matriz extracelular. Dado que el KS está involucrado en procesos de reparación de daño axonal mediante activación de astrocitos, en la estructuración de la matriz extracelular neural y en la función y organización sináptica (H. Zhang, Uchimura, and Kadomatsu 2006), una acumulación anormal de KS en cerebro podría alterar dichas vías en los pacientes de Morquio A. No obstante, sería necesario realizar más investigaciones sobre el posible papel patológico del KS en el cerebro de los pacientes de MPS IVA. De manera similar a los resultados obtenidos en el tratamiento de la patología periférica, el vector AAV9-*Galns* incrementó la expresión y la actividad GALNS en todo el encéfalo, ya que este serotipo es capaz de cruzar la BHE y transducir el SNC (Fu et al. 2011; Ruzo, Marcó, et al. 2012). Este incremento en la actividad GALNS se tradujo en una corrección de los valores de KS y una ausencia completa de material acumulado en las células gliales del isocórtex y de la amígdala.

En varias MPS la falta de una proteína lisosomal genera alteraciones secundarias en la actividad de otras enzimas lisosomales, alterando así la homeóstasis lisosomal (Sardiello et al. 2009; Ribera et al. 2015; Motas et al. 2016). En el hígado de las ratas MPS IVA no tratadas, se detectó un incremento significativo en la actividad β -Hexosaminidasa. En algunas MPS, como en la MPS IIIA, la falta de la enzima lisosomal causante de la enfermedad genera acúmulos secundarios de otros GAGs y de gangliósidos GM3 a causa de un desregulación de la homeostasis lisosomal (Maccari et al. 2017; Dwyer et al. 2017). Tras la administración IV del vector AAV9-*Galns*, las ratas MPS IVA tratadas mostraron niveles de actividad β -Hexosaminidasa normales. Estos resultados demostraron que la restauración de actividad GALNS permitía una corrección de la actividad β -Hexosaminidasa en el hígado, lo que podría indicar que también se podría corregir la actividad de otras enzimas lisosomales alteradas en este órgano.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta aproximación de terapia génica basada en la administración intravenosa de AAV9-*Galns* en ratas MPS IVA, demostraron el potencial de esta estrategia para el tratamiento de la enfermedad de Morquio A. La administración IV del vector AAV9 podría suponer un tratamiento ideal, no sólo para dicha enfermedad, sino también para otras enfermedades con afectación ósea y del cartílago. Esta terapia génica permite una expresión de larga duración y la secreción de enzimas lisosomales al riego sanguíneo dando lugar a la corrección cruzada de tejidos no transducidos. La corrección cruzada (*cross-correction*) permite que la enzima GALNS se sintetice en las células transducidas por el vector AAV9 y se secrete al torrente sanguíneo, donde podrá ser captada por otras células no

transducidas gracias al residuo M6P reconocido por el M6PR de la membrana plasmática (Enns and Huhn 2008). La posibilidad de poder tratar a los pacientes una sola vez en la vida representa una gran ventaja de la terapia génica en comparación con la ERT, la cual tiene un mayor coste económico a causa de la necesidad de administrar la enzima recombinante semanalmente.

En resumen, la presente tesis doctoral proporciona evidencias de corrección en el sistema esquelético, así como de otras alteraciones periféricas característica de la MPS IVA y del SNC después de una única administración IV del vector AAV9-*Galns*. La prueba de eficacia se obtuvo mediante análisis bioquímicos, histológicos, ultraestructurales y funcionales en una nueva rata modelo de la enfermedad MPS IVA que desarrolló la mayoría de las alteraciones detectadas en pacientes. Además, como los animales habían establecido la acumulación de KS a la edad de tratamiento, estos resultados demuestran que el tratamiento podría permitir una reversión de estas patologías. Finalmente, estos resultados proporcionan una sólida evidencia para la futura translación clínica de la transferencia génica mediada por el vector AAV9-*Galns* a pacientes con MPS IVA mediante la administración sistémica del vector terapéutico.

VI. Conclusiones

1. Se ha generado una rata *knock-in* modelo de la MPS IVA introduciendo la mutación *missense* más frecuente en humanos (c.1156C>T) en el gen *Galns* mediante la tecnología CRISPR/Cas9. La rata MPS IVA no presentó actividad GALNS en ninguno de los tejidos analizados.
2. La rata MPS IVA desarrolló los signos clínicos característicos de la enfermedad de Morquio A, incluyendo alteraciones a nivel del tamaño corporal, del cartílago de crecimiento y articular, de los huesos, del esmalte, de la tráquea y del sistema cardiovascular.
3. La administración intravenosa del vector AAV9-GFP en ratas WT resultó en una eficiente y amplia transducción de todos los huesos, los principales órganos periféricos y el encéfalo.
4. Las ratas MPS IVA tratadas con el vector AAV9-*Galns* mostraron niveles estables de actividad GALNS circulante y normalizaron los niveles de KS a largo plazo. La restauración de actividad GALNS permitió también normalizar el tamaño corporal de las ratas MPS IVA y mejorar la tasa de supervivencia.
5. El tratamiento de ratas MPS IVA con AAV9-*Galns* fue capaz de mantener la expresión de *Galns* en el hueso y de normalizar los niveles de KS, mejorando el fenotipo de la placa de crecimiento y la estructura ósea.
6. La terapia génica con el vector AAV9-*Galns* permitió una mejora de las alteraciones patológicas detectadas en las articulaciones de las ratas MPS IVA y normalizó la fuerza de agarre.
7. La administración intravenosa de AAV9-*Galns* fue capaz de transducir las regiones del diente formadas por odontoblastos y ameloblastos, lo que posibilitó la corrección de las alteraciones dentales de las ratas MPS IVA.
8. El tratamiento con AAV9-*Galns* dio lugar a un incremento de la actividad GALNS en los órganos periféricos, lo que permitió la reversión de la acumulación de GAGs en el hígado, la tráquea y las válvulas del corazón, mejorando la frecuencia cardíaca.

9. El vector AAV9-*Galns* normalizó los niveles de KS en el SNC, corrigiendo la presencia de material acumulado en el córtex y la amígdala de las ratas MPS IVA.

10. En resumen, los resultados observados en este trabajo proporcionan una sólida base para la translacionabilidad de una estrategia de terapia génica mediada por vectores AAV9-*Galns* para el tratamiento de la MPS IVA.

VII. Materiales y Métodos

1. MATERIALES

1.1. Animales

Para el desarrollo de la presente tesis doctoral, se han generado ratas *Knock-in* (KI) del gen *Galns*. La rata modelo de la enfermedad de Morquio A (rata MPS IVA o *Galns*^{-/-}) fue generada utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 en la Unidad de Animales Transgénicos del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) en la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Dos RNA guía (gRNA) específicos (*Sigma*) fueron diseñados para hibridar en el exón 11 del gen *Galns* de rata:

- gRNA 1: CCC ATA TTT TAT TAC CGT GGC A
- gRNA 2: TAC CGT GGC AAC ACA CTG ATG G

Se utilizó la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (spCas9) para realizar el corte de doble cadena cerca del lugar de interés del genoma. Además, se diseñó una secuencia de DNA donante de una sola hebra para introducir tanto la mutación *missense* 1162C>T como un nuevo sitio de restricción para *MbolI*, necesario para el genotipado de los animales portadores de la mutación. También se incluyeron dos brazos de homología en el DNA donante para permitir la reparación dirigida por homología con la secuencia genómica de *Galns*. La secuencia del DNA donante se muestra en la Figura 76.

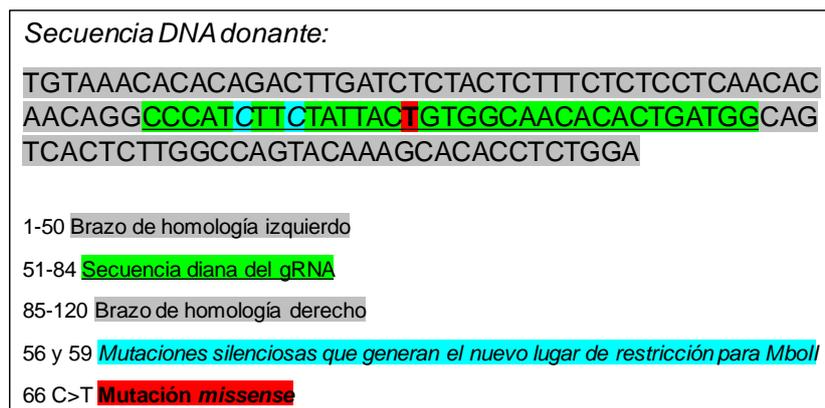


Figura 76. Secuencia del DNA donante diseñado para recombinar e introducir la mutación 1162C>T en el gen *Galns* endógeno.

El gRNA, el DNA donante y el mRNA de la Cas9 se microinyectaron en el pronúcleo de embriones de una célula de fondo genético Sprague Dawley para llevar a cabo la edición génica.

Las ratas KI nacidas tras la edición genética inducida por CRISPR/Cas9, que fueron las ratas de la primera generación (F0), se cruzaron con controles WT sanos selectivamente durante tres generaciones. Esto permitió la segregación cromosómica de los posibles *off-targets* no deseados generados por las CRISPR/Cas9. Finalmente, se obtuvieron ratas KI homocigotas (ratas *Galns*^{-/-} o MPS IVA) en la cuarta generación, mediante el apareamiento de hermanos de camada heterocigotos (*Galns*^{+/-}) de la tercera generación.

Las ratas se mantuvieron estabuladas en el animalario SE-UAB, con acceso libre a agua y comida (Dieta estándar *Teklad, Envigo*) y se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y temperatura estable (22°C ± 2). En las instalaciones del SE-UAB se estableció la colonia de ratas MPS IVA mediante cruces entre ratas heterocigotas para la mutación introducida.

Las ratas WT sanas y MPS IVA se utilizaron para los estudios preclínicos de biodistribución del vector viral 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 9 fueron utilizados para la detección de proteínas mediante análisis inmunohistoquímico.

Tabla 9. Listado de anticuerpos.

Anticuerpo	Huésped	Proveedor	Referencia
Anticuerpos primarios			
Anti-GFP	Cabra	<i>Abcam</i>	ab6673
Anti-Osteocalcin	Ratón	<i>Abcam</i>	ab13420
Anti-LIMP2	Conejo	<i>Novusbio</i>	NB400-129
Anticuerpos secundarios			
AlexaFluor568 anti-Rabbit IgG	Burro	<i>Invitrogen</i>	A10042
AlexaFluor488 anti-Goat IgG	Burro	<i>Life Technologies</i>	A11055

1.4. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en la presente tesis doctoral para el genotipado de alelos y el desarrollo de vectores virales se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10. Listado de plásmidos.

Plásmido	Promotor	Inserto	Señal de poliadenilación
p123T	-	-	-
pAAV-CAG-GFP-WPRE	CAG	GFP-WPRE	β -Globina de conejo
pAAV-CAG-omGALNS	CAG	GALNS de rata optimizada	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).

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. Microinyección en embriones de rata de una célula

Ratas hembra de fondo genético Sprague Dawley fueron superovuladas mediante dos inyecciones intraperitoneales, con PMSG (25UI/hembra) y 52 h después con hCG (30UI/hembra). A continuación, se cruzaron con machos sementales y, a la mañana siguiente tras la detección del tapón vaginal, se obtuvieron embriones de una célula del oviducto de las hembras superovuladas.

Se realizó una microinyección en el pronúcleo de embriones de una célula mediante el uso de un microscopio invertido con óptica de Numarski, acoplado con dos microinyectores y dos micromanipuladores, en la Unidad de Animales Transgénicos del CBATEG. Se microinyectaron 50 ng/μl de mRNA de Cas9, 10 ng/μl de gRNA y 15 ng/μl de DNA donante por embrión de rata. Los embriones que sobrevivieron se transfirieron a hembras receptoras pseudogestantes, con tapón vaginal de 0,5 días post-coito obtenidas tras el cruzamiento con machos vasectomizados. Tras 21 días de gestación, nacieron las crías, al destete se identificaron y se genotiparon a partir de un trozo de cola.

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 Dolly 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 las *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, se siguieron las instrucciones de las diferentes casas comerciales (*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 fosfato del extremo 5' del vector. Para la desfosforilación, se utilizó una unidad de fosfatasa alcalina (*FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas*) en el tampón comercial correspondiente 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 (dNTP), la DNA polimerasa rellena el extremo protuberante generado por la enzima de restricción (actividad polimerasa 5'→3' o 3'→5'). En ausencia de dNTP, 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 2-3 h a temperatura ambiente. Los productos resultantes de la ligación se transformaron en células competentes *E. coli* de la cepa XL2-Blue (*Stratagene-Agilent technologies*).

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 de 5 minutos en hielo, las células se electroporaron a 2.500 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.*). 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.*) y se corrieron con el tampón de electroforesis 1x TAE a 100 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 del DNA se llevaba a cabo en un espectrofotómetro *Nanodrop 1000 spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*).

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 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*) en 1 ml de reactivo de aislamiento, *Tripure* (Roche) para todos los tejidos analizados y *QIAzol* (*QIAGEN*) para el tejido adiposo. A continuación, se siguió el protocolo comercial de purificación de RNA en columnas *Rneasy Mini Kit* (*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.)*.

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* 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 (qPCR), un método muy útil para el análisis de la expresión del mRNA de diversos genes. Se realizó la qPCR para cuantificar la expresión de la versión optimizada del gen *Galns* en diversos tejidos, utilizando los *primers* indicados en la Tabla 11. La qPCR se realizó en el LightCycler® 480 (*Roche*) utilizando LightCycler® 480 SYBR Green I Master (*Roche*), con el gen *Rplp0*, y TaqMan LightCycler® 480 Probe Master, con el gen *Galns*.

Tabla 11. Listado de *primers* utilizados en los estudios de expresión de mRNA por PCR cuantitativa.

	Gen	
	<i>Rplp0</i> de rata	<i>Galns</i> rata optimizada
Primer Forward	5'-AAG CCA CAC TGC TGA ACA TG-3'	5'-CGG AAG GTT CTA CGA AGA GTT C-3'
Primer Reverse	5'-TGC TGC CAT TGT CAA ACA CC-3'	5'-GTG CTG GGT CCT GAT GAA G-3'
Sonda	-	56-FAM/AAC CTG ACC/ZEN/CAG CTG TAC CTG C/3IABkFQ

Cada reacción de qPCR para *Rplp0* y *orGalns* contenía 10 µl de volumen total de mix (Tabla 12).

Tabla 12. Componentes de la reacción de qPCR.

Gen <i>Rplp0</i>	Gen <i>orGalns</i>
Reacción de qPCR con SYBRGreen I	Reacción de qPCR con TaqMan
5 µl LightCycler® 480 Probe Master 2x	5 µl TaqMan LightCycler® 480 Probe Master
0,2 µl <i>primer forward</i> 10 µM (200nM final)	1 µl mix (10x). Contiene <i>primers</i> y sonda
0,2 µl <i>primer reverse</i> 10 µM (200nM final)	
2,6 µl H ₂ O Milli-Q	2 µl H ₂ O Milli-Q
2 µl cDNA diluido 1/10	2 µl 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 expresan en Cts, que indican el ciclo a partir del cual la cantidad del cDNA del gen diana ha amplificado. Las Cts de las muestras de ensayo se ajustaron 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 la presente tesis doctoral se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Estrategia de clonaje de los diferentes plásmidos.

Plásmido	Fuente
p123T-Amplicón PCR	Vector p123T (CBATEG) Digerido con <i>SpeI</i>
	Inserto Amplicón PCR de genotipado (fragmento del exón 11 del gen <i>Galns</i>) Digerido con <i>XmaI</i>
pAAV-CAG-GFP-WPRE	CBATEG
pAAV-CAG- <i>orGalns</i>	Vector pAAV-CAG-PLK (CBATEG) Digerido con <i>MluI</i> y <i>EcoRI</i>
	Inserto pMA-RQ- <i>orGalns</i> (<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 del gen *Galns* de rata, 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 de rata en ratas. La optimización consistió en la eliminación de lugares de *splicing* críticos y de elementos desestabilizantes de secuencia de RNA, estabilizando así la secuencia del mRNA. Además, también se incluyeron elementos estabilizadores de RNA, optimización del 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-orGalns

La CDS del gen *Galns* de rata fue utilizada como secuencia de partida (referencia NCBI: NM_001047851) 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-orGalns.

2.5. Producción, purificación y titulación de vectores virales adenoasociados

2.5.1. Producción y purificación

Los vectores virales AAV9 de cadena simple se generaron en cultivos celulares HEK293 cultivados en *Roller Bottles* (RB) (*Greinner Bio-One*) mediante un protocolo de triple transfección (Eduard Ayuso, Mingozzi, and Bosch 2010) que implica la utilización de 3 plásmidos (Figura 15). 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* (E. Ayuso et al. 2010).

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 o pAAV-CAG-orGalns 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 *Cap9*; 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*.

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 8.000 al 8% (*Sigma*) a 4 °C. Pasado dicho periodo, los vectores se precipitaron por centrifugación a 4.000 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 10.000 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 27.000 rpm durante 17 h en un rotor SW32T (*Beckman*). Las bandas que contenían los vectores (Figura 77) 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 77). Estos tubos se centrifugaron a 38.000 rpm en un rotor SW40Ti (*Beckman*) durante 48 h. Finalmente, los AAV que encapsidaron el transgén se recogieron y dializaron con PBS + 0,001% Plurónico® 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*).

1^{er} Gradiente de CsCl2^o Gradiente de CsCl

816



Figura 77. Purificación de los vectores AAV. El primer gradiente de CsCl permite separar los vectores que contienen el transgén (cápsidas llenas), de la mayor parte de impurezas y cápsidas vacías. El segundo gradiente de CsCl permite separar las cápsidas llenas, de impurezas de densidad similar, como por ejemplo las especies intermedias. *Adaptado de (E. Ayuso et al. 2010).*

2.5.2. Titulación de genomas virales

Los genomas virales de los AAV9 se determinaron por qPCR adecuando el protocolo descrito para AAV2 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 14). 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 cápsidas 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 14. Componentes de la reacción de qPCR.

Reacción TaqMan
5 µl LightCycler® 480 Probe Master 2x
0,2 µl <i>primer forward</i> (10µM)
0,2 µl <i>primer reverse</i> (10µM)
0,1 µl sonda (10µM)
2 µl H ₂ O Milli-Q
2,5 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. La Tabla 15 muestra el título viral final de cada vector utilizado en la presente tesis doctoral.

Tabla 15. Título de genomas virales.

Vector viral	Título (vg/ml)
AAV9-CAG-GFP-WPRE	4,40x10 ¹³
	1,13x10 ¹³
AAV9-CAG-orGALNS	3,55x10 ¹³
	5,54x10 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-600 (de concentración conocida cuantificada anteriormente) con el tampón 4x *Novex® Tris-Glycine LDS Sample Buffer (Invitrogen)* y 10x *NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen)* hasta un volumen final de 20 μ l. 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 78).

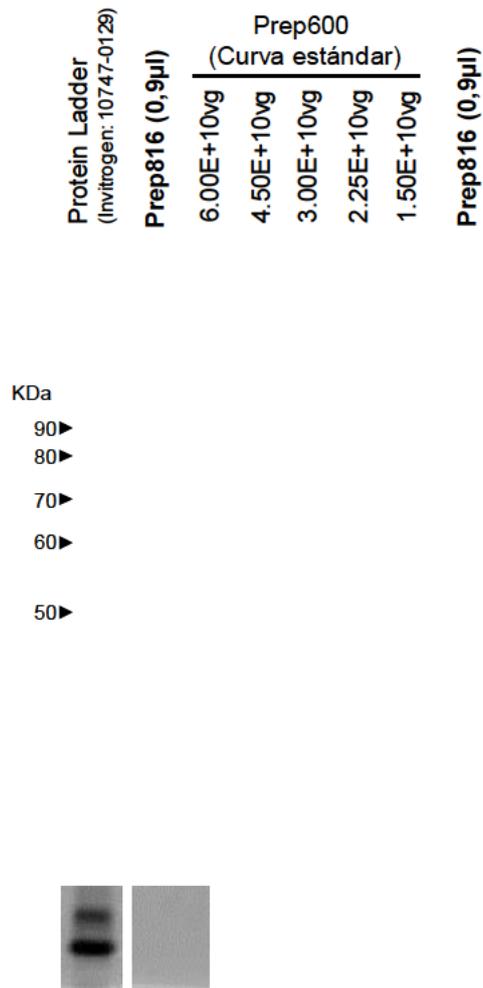
AAV9-CAG-orGalns

Figura 78. 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 (Prep816) producido y utilizado en esta tesis doctoral.

El título de las partículas virales se obtuvo por densitometría. A partir de la intensidad de la VP3 de cada dilución del vector AAV-600 se generó una curva estándar para cuantificar las partículas virales de las diferentes preparaciones.

2.6. Genotipado de las ratas

Las ratas KI para el gen *Galns* se genotiparon mediante análisis por PCR del DNA genómico obtenido de un fragmento de la cola. Esto permitió la detección de la mutación 1162C>T introducida en el exón 11 del gen *Galns* de rata.

2.6.1. Purificación de DNA genómico

La obtención del DNA genómico se hizo a partir de muestras de cola (~1 cm de longitud) de ratas de 3-4 semanas de edad, según una adaptación del método de extracción de DNA 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 12.000 *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 12.000 *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. Genotipado por PCR

El genotipado se llevó a cabo utilizando el *kit* comercial de *PCR Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/µl) (*ThermoFisher Scientific*) en un volumen final de 25 µl (Tabla 16).

Tabla 16. Componentes de la reacción de PCR.

Reacción de PCR	
Reactivos	Volumen
5X GoTaq PCR HF Buffer (Green)	5 µl
25 mM dNTP	0,2 µl
50uM <i>primer Fw</i>	1,25 µl
50uM <i>primer Rv</i>	1,25 µl
Phusion Hot StartII DNA Pol	0,25 µl
H2O Milli-Q	16,05 µl
DNA genómico	1 µl

La reacción consistía en una desnaturalización inicial de 31 min a 95°C seguida de 35 ciclos con una desnaturalización (10 s a 95°C), *annealing* (30 s a 60°C) y elongación (30 s a 72°C), y finalmente, una fase de elongación de 5 min a 72°C.

Los *primers* utilizados para el genotipado fueron:

- *Galns-Fw*: 5'-TGT GGT GTG ACC ATT CAC CT-3'
- *Galns-Rv*: 5'-TTT GTC AGC CCC ATT TCC TA-3'

La reacción de PCR generó un amplicón de 915 pb que fue digerido adicionalmente con la enzima de restricción *MbolI* (*ThermoFisher Scientific*). Se añadieron 0,3 µl de la enzima de restricción *MbolI* junto a 3 µl de *Buffer B* (*ThermoFisher Scientific*) a cada muestra y se dejaron incubar durante 2 h a 37°C. La digestión con *MbolI* generó 3 fragmentos de 697, 142 y 76 pb en el alelo WT; y 381, 316, 142 y 76 pb en el alelo MPS IVA (rata KI) (Figura 79). Finalmente, el producto de la digestión por *MbolI* se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% w/v, y se visualizó en un transiluminador.

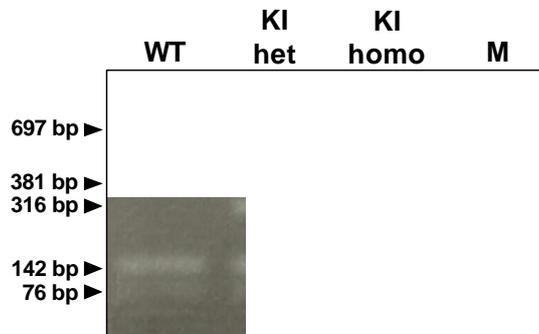


Figura 79. Imagen representativa del genotipado de ratas en un gel de agarosa. El patrón de bandas indica el genotipo de cada animal, mostrando ratas WT, heterocigotas (KI het) y homocigotas (KI homo) para la mutación introducida en el gen *Galns*. M: Marcador de bases.

2.6.3. Genotipado por secuenciación de Sanger

La secuenciación de Sanger de los amplicones generados por PCR se realizó utilizando los mismos *primers Fw* y *Rv* utilizados en el genotipado por PCR, pero a una concentración de 5 µM. La banda única de los amplicones obtenidos por PCR fue purificada por *ExoSAP-IT* (*ThermoFisher Scientific*) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Se secuenció 1 µl del DNA purificado con *primers Fw* y *Rv* utilizando el kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (*ThermoFisher Scientific*) y la reacción fue purificada mediante *pBigdye Xterminator* (*ThermoFisher Scientific*).

La electroforesis se realizó en un analizador genético ABI 3130xl (*ThermoFisher Scientific*) con un capilar de 50 cm, y se analizó con el software de secuenciación Sanger

(*ThermoFisher Scientific*). La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Servicio de Genómica y Bioinformática de la UAB.

Los amplicones de Sanger se alinearon con una secuencia *Galns* WT de referencia para detectar el alelo MPS IVA introducido en las ratas KI y se analizó mediante el software *Sequencher 5.4.5*. (*GeneCodes*) tal y como muestra la Figura 80.

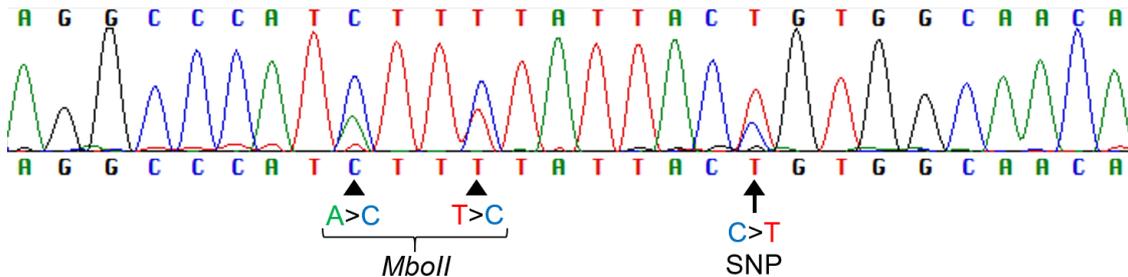


Figura 80. Genotipado por secuenciación de Sanger: Ejemplo de electroferograma mostrando el alelo KI en heterocigosis tras la secuenciación de Sanger.

Los amplicones de Sanger se analizaron también utilizando el software TIDE (*Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition*). TIDE es una herramienta web que evalúa de forma rápida y confiable la edición del genoma de un locus objetivo mediante CRISPR/Cas9. Está basado en la secuencia cuantitativa, los datos de seguimiento de dos reacciones de secuenciación capilar estándar (Sanger), TIDE cuantifica la eficacia de edición e identifica los tipos predominantes de inserciones y deleciones (*indels*) en el DNA de un conjunto de células objetivo (Brinkman et al. 2014).

2.6.4. Secuenciación de alelos *Galns* por separado

La secuenciación de alelos se realizó a partir de los amplicones de PCR obtenidos con los *primers* de genotipado (ver apartado 2.6.2.). Estos amplicones se digirieron con 1 μ l de *XmaJI* + 4 μ l de buffer T durante 3 h a 37 °C. Se purificó la digestión mediante el kit *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN), eluyendo el producto final en 30 μ l de H₂O Milli-Q. La cuantificación el DNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro *Nanodrop 1000 spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*).

Se digirieron 10 μ g del plásmido p123T, utilizado como *backbone*, con 3 μ l de *SpeI* + 5 μ l de buffer T durante 2 h a 37 °C. El DNA plasmídico se purificó con el protocolo

de *GeneJET® Gel Extraction (ThermoScientific)* y se defosforiló siguiendo el protocolo del apartado 2.2.3. Se ligó cada amplicón tal como se explica en el apartado 2.2.5. con 50 ng de plásmido p123T mediante ligación dirigida. Después, se transformaron las ligaciones en bacterias *E. coli* XL2Blue (ver apartado 2.2.6), se realizaron *minipreps* (ver apartado 2.2.1.) de 6 colonias y se realizó una digestión con 0,5 µl de *DraI* 5 µl + 2 µl de buffer T durante 1:30 h a 37 °C para demostrar que el amplicón de PCR se había insertado correctamente en el p123T.

El producto de las *miniprep* se secuenció utilizando los *primers T3* y *T7* que se encontraban en el p123T flanqueando al amplicón de PCR. Las secuencias de los *primers* son las siguientes:

- *Primer T3*: 5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG G-3'
- *Primer T7*: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG G-3'

Se secuenciaron 100 ng de plásmido mediante un analizador genético ABI 3130xl (*ThermoFisher Scientific*) con un capilar de 50 cm, y se analizó con el software de secuenciación Sanger (*ThermoFisher Scientific*). La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Servicio de Genómica y Bioinformática de la UAB.

Los amplicones de Sanger se alinearon con una secuencia *Galns* WT de referencia para detectar el alelo MPS IVA introducido en las ratas KI y se analizó mediante el software *Sequencher 5.4.5. (GeneCodes)* tal y como muestra la Figura 80.

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 300-400 µl con PBS + 0,001% Plurónico® F68 (*Gibco – Life Technologies*) y se administró por vía intravenosa (IV) en una de las venas caudales laterales de la rata, 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 ratas

Desde la administración IV de los vectores hasta la eutanasia de las ratas, se realizaron extracciones periódicas de sangre. Para la obtención de sangre se inmovilizó a la rata y se recogieron entre 200 y 400 μ l de sangre de la vena safena o la vena submandibular. Finalmente, la sangre se centrifugó a 1.200 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 ratas

En el momento de la eutanasia, las ratas fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de Ketamina (80 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 100 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. Los tejidos blandos se fijaron en formalina al 10% (*PanReac AppliChem*) para realizar su posterior inclusión en bloques de parafina.

2.10. Protocolo de descalcificación de huesos de rata

Los huesos de rata (mandíbula, extremidad anterior y posterior) se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% (*Sigma*) a 4 °C durante 48 h. La fijación de los huesos se paró mediante 4 lavados con PBS 1X de 15 min cada uno. Una vez eliminados los restos de fijador, se añadió ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disuelto en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) para descalcificar progresivamente los huesos mediante cambios de EDTA diarios la primera semana y, a continuación, cambios de EDTA semanales durante 3-6 semanas hasta conseguir el ablandamiento del tejido óseo. Una vez descalcificados, los huesos se incluyeron en parafina y se seccionaron para los posteriores estudios histológicos.

2.11. 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.*). Una vez se obtuvieron los homogeneizados, se centrifugaron a 12.000 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.*).

2.12. 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*) siguiendo las indicaciones de la casa comercial *Moscerdam Substrates* (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*) (0,1 M 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) azida de sodio) 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) 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 2.11.).

2.13. Determinación de actividad β-Hexosaminidasa

La actividad enzimática β-Hexosaminidasa se determinó de forma similar a la actividad GALNS, partiendo de 0,1 µg de proteína total de extracto proteico de hígado. Se incubó 1 h a 37°C con 20 µl de sustrato *4-MU-N-acetyl-β-glucosaminide* diluido en el tampón indicado por la casa comercial (*Sigma*) (0,2M Tampón fosfato/0,1M Tampón citrato pH 4,4). Finalmente, la reacción se paró, se midió y se calculó de la misma manera que en el apartado 2.12.

2.14. 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 10.000 g. El sobrenadante se filtró (*Ultrafree, MC, Millipore*) por centrifugación 5 min a 12.000 g.

Para la cuantificación de queratán sulfato, el filtrado se digirió con Keratanasa II a 40°C durante 3 h. Tras la digestión se obtuvieron 2 disacáridos: Gal β 1-4GlcNAc(6S) y Gal(6S) β 1-4GlcNAc(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 3 h. 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 10.000 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.

2.15. 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 realizaron cortes histológicos con un microtomo *Leica RM2135 (Leica Biosystems)*. En el caso de los huesos, previo a la generación del bloque de parafina, las muestras se sometieron a un proceso de descalcificación con EDTA (ver apartado 2.10.) y luego se incluyeron en parafina. Una vez desparafinadas, las secciones se incubaron o/n a 4°C con los anticuerpos primarios específicos (ver apartado 1.3). Se realizaron 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.)*, el cual utiliza 3,3'-diaminobenzidina como cromógeno. Las imágenes en campo claro se obtuvieron con un microscopio óptico *Eclipse 50i o 90i (Nikon Instruments Inc.)* y las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un microscopio confocal *Olympus Fluoview 1000 o (Olympus Corporation)* o un microscopio *Leica SP5 (Leica Biosystems)*.

2.16. Tinción hematoxilina-eosina y *Safranin Orange*

Tras la extracción de los tejidos, 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)*. En el caso de los huesos, previo a la generación del bloque de parafina, las muestras se sometieron a un proceso de descalcificación con EDTA (ver apartado 2.10.) y luego se incluyeron en parafina.

Para la tinción de hematoxilina-eosina, las muestras se desparafinaron, se rehidrataron mediante cambios decrecientes de xilol y alcoholes, y posteriormente se tiñeron con hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Se añadió HCl 0,25% para diferenciar y luego se tiñeron con eosina durante 1 min. Tras una deshidratación rápida con alcohol (A.96° I y II, A.100°) y una transparentación (Xilol I, II y III de 5 min cada uno) se montaron los cortes con DPX.

Para la tinción de *Safranin Orange*, las muestras se desparafinaron, se rehidrataron y posteriormente se tiñeron con hematoxilina de Weigert durante 5 minutos. Se añadió HCl 1%, disuelto en etanol 70%, para diferenciar y luego se tiñeron con 0,02% de Fast Green durante 1 min. Se diferenció con 1% de ácido acético, disuelto en etanol 70%, durante 30 s y finalmente se tiñó con 1% de *Safranin Orange* durante 10 minutos. Tras una deshidratación rápida, las muestras se transparentaron y montaron.

2.17. Cuantificación del área de la placa de crecimiento en campo claro

Para cuantificar el área de la placa de crecimiento de los cortes histológicos de los húmeros de rata, se utilizó el programa *NIS Elements Advanced Research 2.20 (Nikon Instruments)*. Se realizaron entre 4 y 6 fotos de las placas de crecimiento del húmero teñidas con *Safranin Orange* con un microscopio óptico *Eclipse 90i (Nikon Instruments Inc.)*. El porcentaje de área de cartílago de crecimiento se calculó como el área de cartílago de crecimiento seleccionado manualmente (el color rojo de la tinción con *Safranin Orange* indica la fracción cartilaginosa seleccionada) en relación con el área total de la imagen.

2.18. Microscopia electrónica de transmisión

Las ratas fueron eutanasiadas por sobredosis de ketamina/xilacina intraperitoneal. Una pequeña porción de cada tejido se diseccionó e incubó a 4 °C durante 2 h en 1 ml de glutaraldehído al 2,5% y PFA al 2% como fijador. Después de varios lavados con tampón fosfato sódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) frío, los tejidos se fijaron con tetraóxido de osmio al 1% y 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*).

2.19. Tinción con azul de toluidina en secciones semifinas

Secciones semifinas de los bloques de resina *epoxi* (800 nm) (ver apartado 2.18) se tiñeron durante 30 s con azul de toluidina (*Electron Microscopy Science*) disuelto en agua Milli-Q en presencia de tetraborato sódico.

2.20. 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 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.*). Una vez se obtuvieron los homogeneizados, se centrifugaron a 10.500 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 2.11).

2.21. Análisis óseo por microtomografía computarizada (μ CT) de rayos X

El volumen y la arquitectura ósea se evaluaron mediante análisis de μ CT. Los huesos de rata se fijaron en formalina neutra tamponada (4%) y se escanearon utilizando el escáner *CT eXplore Locus (General Electric)* a una resolución de 27 μ m. La diáfisis del fémur se midió en 6 cm³ de la zona distal al tercer trocánter. La metáfisis femoral y tibial se midió en 2,5 cm³ por debajo de la placa de crecimiento. La diáfisis de la tibia se midió en 6 cm³ de la zona distal al borde craneal. La longitud de la tibia se midió desde el cóndilo medial hasta el maléolo medial. Los parámetros óseos se calcularon con *MicroView 3D Image Viewer & Analysis Tool* (software de visualización de imágenes en 3D de código abierto).

2.22. Test de fuerza de agarre (GST)

La fuerza de agarre de las ratas se midió como la fuerza de tracción máxima de las 4 patas registrada con un medidor de fuerza de agarre de rata (*PanLab*), equipado con un sensor con una capacidad de 25 Newtons y una precisión de 0,1%. Un máximo de tres tirones del medidor de fuerza de agarre realizado entre las 12 P.M. y 18 P.M. se registró y promedió.

2.23. Análisis de la frecuencia cardíaca

Las ratas se colocaron en posición supina, lo que permitió el suministro de anestesia (isoflurano, 3,0-4,0% en O₂ a 1 L/min) durante 3 minutos. Los electrodos se colocaron en el área pectoral y femoral para registrar los latidos por minuto (BPM) durante 2 minutos una vez la respiración de la rata fuera estable. Las ratas se mantuvieron en el electrocardiógrafo con 2-4% de isoflurano al 1% de oxígeno durante el registro de la frecuencia cardíaca.

2.24. Medición de la longitud naso-anal

Las ratas se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (80 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente) y se colocaron en posición supina. Se midió la distancia entre la parte más rostral de la cabeza y la parte más caudal del abdomen (base de la cola).

2.25. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante la prueba *t* de *Student* en el caso de comparar el grupo de estudio con un grupo control o con el análisis de la variancia de un factor (ANOVA) para las comparaciones múltiples de varios grupos contra un grupo control, que 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

- Aldenhoven, Mieke, Simon A. Jones, Denise Bonney, Roisin E. Borrill, Mary Coussons, Jean Mercer, Marc B. Bierings, et al. 2015. "Hematopoietic Cell Transplantation for Mucopolysaccharidosis Patients Is Safe and Effective: Results after Implementation of International Guidelines." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 21 (6): 1106–9.
- Alejandra, Hernández, Olga Velásquez, Felice Leonardi, Carlos Soto, Alexander Rodríguez, Lina Lizaraso, Ángela Mosquera, et al. 2013. "Effect of Culture Conditions and Signal Peptide on Production of Human Recombinant N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase in Escherichia Coli BL21." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 (5): 689–98.
- Alméciga-Díaz, Carlos, Oscar A Hidalgo, Sergio Olarte-Avellaneda, and Alexander Rodriguez-Lopez. 2018. "Characterization of Two Potential Pharmacological Chaperones for N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfates (GALNS) Enzyme." *Molecular Genetics and Metabolism* 123 (2).
- Alméciga-Díaz, Carlos J., Adriana M. Montaña, Shunji Tomatsu, and Luis A. Barrera. 2010. "Adeno-Associated Virus Gene Transfer in Morquio A Disease - Effect of Promoters and Sulfatase-Modifying Factor 1." *FEBS Journal* 277 (17): 3608–19.
- Alméciga-Díaz, Carlos, Adriana Montaña, Shunji Tomatsu, and Luis Barrera. 2012. "Contribución Colombiana Al Conocimiento de La Enfermedad de Morquio A." *Medicina*. Vol. 34.
- Alméciga-Díaz, Carlos, María Andrea Rueda-Páramo, Olga Yaneth Echeverri, Adriana María Montaña, Shunji Tomatsu, and Luis Alejandro Barrera. 2009. "Uso de Vectores Derivados de Virus Adenoasociados Para El Tratamiento de La Enfermedad de Morquio A." *Universidad Médica Bogotá* 50 (3): 356–79.
- Aronovich, Elena L., Jason B. Bell, Shaukat A. Khan, Lalitha R. Belur, Roland Gunther, Brenda Koniar, Patricia A. Schachern, et al. 2009. "Systemic Correction of Storage Disease in MPS I NOD/SCID Mice Using the Sleeping Beauty Transposon System." *Molecular Therapy* 17 (7): 1136–44.
- Atchison, R. W., B. C. Casto, and W. McD. Hammon. 1965. "Adenovirus-Associated Defective Virus Particle." *Science (New York, N.Y.)* 149 (3685): 754–56.
- Ayabe, Shinya, Kenichi Nakashima, and Atsushi Yoshiki. 2019. "Off- and on-Target Effects of Genome Editing in Mouse Embryos." *Journal of Reproduction and Development* 65 (1): 1–5.
- Ayuso, E., F. Mingozzi, J. Montane, X. Leon, X. M. Anguela, V. Haurigot, S. A. Edmonson, et al. 2010. "High AAV Vector Purity Results in Serotype- and Tissue-Independent Enhancement of Transduction Efficiency." *Gene Therapy* 17 (4): 503–10.
- Ayuso, Eduard, Federico Mingozzi, and Fatima Bosch. 2010. "Production, Purification and Characterization of Adeno-Associated Vectors." *Current Gene Therapy* 10 (6): 423–36.
- Bainbridge, J W B, M S Mehat, V Sundaram, S J Robbie, S E Barker, and C Ripamonti. 2015. "Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis." *N Engl J Med* 372 (20): 1887–97.
- Baker, Elizabeth, Xiao Hui Guo, Annette M. Orsborn, Grant R. Sutherland, David F. Callen, John J. Hopwood, and C. Phillip Morris. 1993. "The Morquio A Syndrome

(Mucopolysaccharidosis IVA) Gene Maps to 16q24.3." *American Journal of Human Genetics* 52 (1): 96–98.

Baldo, Guilherme, Fabiana Quoos Mayer, Barbara Martinelli, Fabiola Schons Meyer, Maira Burin, Luise Meurer, Angela Maria Vicente Tavares, Roberto Giugliani, and Ursula Matte. 2012. "Intraperitoneal Implant of Recombinant Encapsulated Cells Overexpressing Alpha-L-Iduronidase Partially Corrects Visceral Pathology in Mucopolysaccharidosis Type i Mice." *Cytotherapy* 14 (7): 860–67.

Bali, Deeksha S, Jennifer L Goldstein, Suhrad Banugaria, Jian Dai, Joanne Mackey, Catherine Rehder, and Priya S Kishnani. 2012. "Predicting Cross-Reactive Immunological Material (CRIM) Status in Pompe Disease Using GAA Mutations: Lessons Learned from 10 Years of Clinical Laboratory Testing Experience." *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 160C (1): 40–49.

Barrow, Paul C. 2007. "Toxicology Testing for Products Intended for Pediatric Populations." In *Nonclinical Drug Safety Assessment Practical Considerations for Successful Registration*, 411–40. Washington, DC.

Bathe, Mark, Gregory C. Rutledge, Alan J. Grodzinsky, and Bruce Tidor. 2005. "Osmotic Pressure of Aqueous Chondroitin Sulfate Solution: A Molecular Modeling Investigation." *Biophysical Journal* 89 (4): 2357–71.

Bayliss, Michael T., David Osborne, Sandra Woodhouse, and Catherine Davidson. 1999. "Sulfation of Chondroitin Sulfate in Human Articular Cartilage: The Effect of Age, Topographical Position, and Zone of Cartilage on Tissue Composition." *Journal of Biological Chemistry* 274 (22): 15892–900.

Bennike, Tue, Ugur Ayturk, Carla M. Haslauer, John W. Froehlich, Benedikt L. Proffen, Omar Barnaby, Svend Birkelund, et al. 2014. "A Normative Study of the Synovial Fluid Proteome from Healthy Porcine Knee Joints." *Journal of Proteome Research* 13 (10): 4377–87.

Berrier, Kathryn L., Zoheb B. Kazi, Sean N. Prater, Deeksha S. Bali, Jennifer Goldstein, Mihaela C. Stefanescu, Catherine W. Rehder, et al. 2015. "CRIM-Negative Infantile Pompe Disease: Characterization of Immune Responses in Patients Treated with ERT Monotherapy." *Genetics in Medicine* 17 (11): 912–18.

Bhattacharya, Kaustuv, Shanti Balasubramaniam, Yew S.ing Choy, Michael Fietz, Antony Fu, Dong K.yu Jin, Ok Hwa Kim, et al. 2014. "Overcoming the Barriers to Diagnosis of Morquio A Syndrome." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9: 192.

Birnboim, and Dolly. 1979. "Murray MG, Thompsom W. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*; 1980; 8(19):4321–6." 7 (6): 1–11.

Brinkman, Eva K., Tao Chen, Mario Amendola, and Bas Van Steensel. 2014. "Easy Quantitative Assessment of Genome Editing by Sequence Trace Decomposition." *Nucleic Acids Research* 42 (22).

Brusius-Facchin, Ana Carolina, Marina Siebert, Delva Leão, Diana Rojas Malaga, Gabriela Pasqualim, Franciele Trapp, Ursula Matte, Roberto Giugliani, and Sandra Leistner-Segal. 2019. "Phenotype-Oriented NGS Panels for Mucopolysaccharidoses: Validation and Potential Use in the Diagnostic Flowchart." *Genetics and Molecular Biology* 42 (1 suppl 1): 207–14.

Buchlis, George, Gregory M. Podsakoff, Antonetta Radu, Sarah M. Hawk, Alan W. Flake, Federico Mingozzi, and Katherine A. High. 2012. "Factor IX Expression in Skeletal Muscle of a Severe Hemophilia B Patient 10 Years after AAV-Mediated Gene Transfer." *Blood* 119 (13): 3038–41.

Burton, Barbara K., Kenneth I. Berger, Gregory D. Lewis, Mark Tarnopolsky, Marsha Treadwell, John J. Mitchell, Nicole Muschol, 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." *American Journal of Medical Genetics, Part A* 167 (10): 2272–81.

Byrne, Barry J., David D. Fuller, Barbara K. Smith, Nathalie Clement, Kirsten Coleman, Brian Cleaver, Lauren Vaught, Darin J. Falk, Angela McCall, and Manuela Corti. 2019. "Pompe Disease Gene Therapy: Neural Manifestations Require Consideration of CNS Directed Therapy." *Annals of Translational Medicine* 7 (13): 290–290.

Chen, Bang Dang, Chun Hui He, Xiao Cui Chen, Shuo Pan, Fen Liu, Xiang Ma, Xiao Mei Li, et al. 2015. "Targeting Transgene to the Heart and Liver with AAV9 by Different Promoters." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 42 (10): 1108–17.

Cheng, S. H., and A. E. Smith. 2003. "Gene Therapy Progress and Prospects: Gene Therapy of Lysosomal Storage Disorders." *Gene Therapy* 10 (16): 1275–81.

Chinen, Yasutsugu, Takeshi Higa, Shunji Tomatsu, Yasuyuki Suzuki, Tadao Oorii, and Nobuyuki Hyakuna. 2014. "Long-Term Therapeutic Efficacy of Allogenic Bone Marrow Transplantation in a Patient with Mucopolysaccharidosis IVA." *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 1 (1): 31–41.

Chuang, Chih Kuang, Hsiang Yu Lin, Tuan Jen Wang, Sung Fa Huang, and Shuan Pei Lin. 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 (7): 1–8.

Cimaz, Rolando, and Francesco La Torre. 2014. "Mucopolysaccharidoses." *Current Rheumatology Reports* 16 (1): 389.

Cimaz, Rolando, Suresh Vijay, Claudia Haase, Giovanni Valentino Coppa, Stefano Bruni, Ed Wraith, and Natalie Guffon. 2006. "Attenuated Type I Mucopolysaccharidosis in the Differential Diagnosis of Juvenile Idiopathic Arthritis: A Series of 13 Patients with Scheie Syndrome." *Clinical and Experimental Rheumatology* 24 (2): 196–202.

Colmenares-Bonilla, Douglas, and Nayeli Esquitin-Garduño. 2017. "Diagnosis of Morquio-A Patients in Mexico: How Far Are We from Prompt Diagnosis?" *Intractable and Rare Diseases Research* 6 (2): 119–23.

Cosma, Maria Pia, Stefano Pepe, Ida Annunziata, Robert F Newbold, Markus Grompe, Giancarlo Parenti, and Andrea Ballabio. 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: 445–56.

Couprrie, J., P. Denis, H. Masset, F. Beby, N. Guffon, and N. Reynes. 2010. "Ocular Manifestations in Patients Affected by Morquio Syndrome (MPS IV)." *Journal*

Francais d'Ophtalmologie 33 (9): 617–22.

Cozma, Claudia, Sabrina Eichler, Gyula Wittmann, Alba Flores Bonet, Guido Johannes Kramp, Anne Katrin Giese, and Arndt Rolfs. 2015. "Diagnosis of Morquio Syndrome in Dried Blood Spots Based on a New MRM-MS Assay." *PLoS ONE* 10 (7): 1–14.

Danes, B. Shannon. 1973. "Corneal Clouding in the Genetic Mucopolysaccharidoses: A Cell Culture Study." *Clinical Genetics* 4 (1): 1–7.

Davidoff, Andrew M., Catherine Y. C. Ng, Junfang Zhou, Yunyu Spence, and Amit C. Nathwani. 2003. "Sex Significantly Influences Transduction Of murine Liver by Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors through an Androgen-Dependent Pathway." *Blood* 102 (2): 480–88.

Davison, J. E., S. Kearney, J. Horton, K. Foster, A. C. Peet, and C. J. Hendriksz. 2013. "Intellectual and Neurological Functioning in Morquio Syndrome (MPS IVa)." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 36 (2): 323–28.

Desnick, Robert J., and Edward H. Schuchman. 2002. "Enzyme Replacement and Enhancement Therapies: Lessons from Lysosomal Disorders." *Nature Reviews Genetics* 3 (12): 954–66.

Diggelen, O. P. van, H. Zhao, W. J. Kleijer, H. C. Janse, B. J.H.M. Poorthuis, J. van Pelt, J. P. Kamerling, and H. Galjaard. 1990. "A Fluorimetric Enzyme Assay for the Diagnosis of Morquio Disease Type A (MPS IV A)." *Clinica Chimica Acta* 187 (2): 131–39.

Disbrow, Gary L., Iruvanti Sunitha, Carl C. Baker, John Hanover, and Richard Schlegel. 2003. "Codon Optimization of the HPV-16 E5 Gene Enhances Protein Expression." *Virology* 311 (1): 105–14.

Doherty, Caitlin, Lauren W. Averill, Mary Theroux, William G. Mackenzie, Christian Pizarro, Robert W. Mason, and Shunji Tomatsu. 2018. "Natural History of Morquio A Patient with Tracheal Obstruction from Birth to Death." *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 14 (December 2017): 59–67.

Doherty, Caitlin, Molly Stapleton, Matthew Piechnik, Robert W. Mason, William G. Mackenzie, Seiji Yamaguchi, Hironori Kobayashi, Yasuyuki Suzuki, and Shunji Tomatsu. 2019. "Effect of Enzyme Replacement Therapy on the Growth of Patients with Morquio A." *Journal of Human Genetics* 64 (7): 625–35.

Dũng, Vu Chi, Shunji Tomatsu, Adriana M Montañó, Gary Gottesman, Michael B Bober, William Mackenzie, Miho Maeda, Grant A Mitchell, Yasuyuki Suzuki, and Tadao Orii. 2013. "Mucopolysaccharidosis IVA: Correlation between Genotype, Phenotype and Keratan Sulfate Levels." *Mol Genet Metab* 110 (0): 129–38.

Duque, Sandra, Béatrice Joussemet, Christel Riviere, Thibaut Marais, Laurence Dubreil, Anne Marie Douar, John Fyfe, Philippe Moullier, Marie Anne Colle, and Martine Barkats. 2009. "Intravenous Administration of Self-Complementary AAV9 Enables Transgene Delivery to Adult Motor Neurons." *Molecular Therapy* 17 (7): 1187–96.

Dutta, Raini, Mary M. Lunzer, Jennifer L. Auger, Eyup Akgün, Philip S. Portoghese, and Bryce A. Binstadt. 2018. "A Bivalent Compound Targeting CCR5 and the Mu Opioid Receptor Treats Inflammatory Arthritis Pain in Mice without Inducing Pharmacologic Tolerance." *Arthritis Research and Therapy* 20 (1): 1–10.

Duve, Christian De. 2005. "The Lysosome Turns Fifty." *Nature Cell Biology* 7 (9): 847–49.

Dvorak-Ewell, Melita, Dan Wendt, Chuck Hague, Terri Christianson, Vish Koppaka, Danielle Crippen, Emil Kakkis, and Michel Vellard. 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 (8).

Dwyer, Chrissa A., Samantha L. Scudder, Ying Lin, Lara E. Dozier, Dustin Phan, Nicola J. Allen, Gentry N. Patrick, and Jeffrey D. Esko. 2017. "Neurodevelopmental Changes in Excitatory Synaptic Structure and Function in the Cerebral Cortex of Sanfilippo Syndrome IIIA Mice." *Scientific Reports* 7 (April): 1–11.

Elliott, R.J., and D.L. Gardner. 1979. "Changes with Age in the Structure of Fibromodulin in Human Articular Cartilage." *Annals of the Rheumatic Diseases* 38: 371–77.

Enns, Gregory M., and Stephen L. Huhn. 2008. "Central Nervous System Therapy for Lysosomal Storage Disorders." *Neurosurgical Focus* 24 (3–4): E12.

Evans, Christopher H., Steven C. Ghivizzani, and Paul D. Robbins. 2018. "Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection." *Human Gene Therapy* 29 (1): 2–14.

Falaki, Mona M. El, Marian Y. Girgis, Aliaa A. Ali, Mohamed A. Elmonem, and Heba M. Ismail. 2014. "Assessment of Respiratory Involvement in Children with Mucopolysaccharidosis Using Pulmonary Function Tests." *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 15 (1): 79–85.

Flanagan, Michael, Qi Gana, Ryan Emmett, Salem Akel, and Adriana Montaña. 2018. "Improvement of Enzyme Activity in Vitro of Galns Deficient Fibroblasts by Umbilical Mesenchymal Stem Cell-Mediated Microvesicles." In *WorldSymposium*, 48–49. San Diego.

Forriol, Francisco, and Frederic Shapiro. 2005. "Bone Development: Interaction of Molecular Components and Biophysical Forces." *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 432: 14–33.

Foust, Kevin, Emiy Nurre, Chrystal Montgomery, Anna Hernandez, Curtis Chan, and Brian Kaspar. 2009. "Intravascular AAV9 Preferentially Targets Neonatal-Neurons and Adult-Astrocytes in CNS." *Nat Biotechnol.* 27 (1): 59–65.

Franceschi, L. De, L. Roseti, G. Desando, A. Facchini, and B. Grigolo. 2007. "A Molecular and Histological Characterization of Cartilage from Patients with Morquio Syndrome." *Osteoarthritis and Cartilage* 15 (11): 1311–17.

Fu, Haiyan, Julianne Dirosario, Smruti Killedar, Kimberly Zaraspe, and Douglas M. McCarty. 2011. "Correction of Neurological Disease of Mucopolysaccharidosis IIIB in Adult Mice by RAAV9 Trans-Blood-Brain Barrier Gene Delivery." *Molecular Therapy* 19 (6): 1025–33.

Fukuda, Seiji, Shunji Tomatsu, Michiya Masue, Kazuko Sukegawa, Hideki Iwata, Tatsuya Ogawa, Yoshihiro Nakashima, et al. 1992. "Mucopolysaccharidosis Type IVA: N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase Exonic Point Mutations in Classical Morquio and Mild Cases." *Journal of Clinical Investigation* 90 (3): 1049–53.

Fukuda, Seiji, Shunji Tomatsu, Mitsuo Masuno, Tatsuya Ogawa, Atsushi Yamagishi, Golam Md. Maruf Rezvi, Kazuko Sukegawa, 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.” *Human Mutation* 7 (2): 123–34.
- Funderburgh, James L. 2000. “Keratan Sulfate: Structure, Biosynthesis, and Function.” *Connective Tissue* 10 (10): 951–58.
- Gao, G.-P., Mauricio R Alvira, Lili Wang, Roberto Calcedo, Julie Johnston, and James M Wilson. 2002. “Novel Adeno-Associated Viruses from Rhesus Monkeys as Vectors for Human Gene Therapy.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (18): 11854–59.
- Gao, Guangping, Luk Vandenberghe, and James Wilson. 2005. “New Recombinant Serotypes of AAV Vectors.” *Current Gene Therapy* 5 (3): 285–97.
- Gipson, IK, NC Joyce, and JD Zieske. 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*. 4th ed.
- Gloessl, J., W. Truppe, and H. Kresse. 1979. “Purification and Properties of N-Acetylgalactosamine 6-Sulphate Sulphatase from Human Placenta.” *Biochemical Journal* 181 (1): 37–46.
- Goldberg, Andy, Katrina Mitchell, Julian Soans, Louise Kim, and Razi Zaidi. 2017. “The Use of Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair and Regeneration: A Systematic Review.” *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 12 (1): 1–30.
- Grimm, D., J. S. Lee, L. Wang, T. Desai, B. Akache, T. A. Storm, and M. A. Kay. 2008. “In Vitro and In Vivo Gene Therapy Vector Evolution via Multispecies Interbreeding and Retargeting of Adeno-Associated Viruses.” *Journal of Virology* 82 (12): 5887–5911.
- Gutiérrez, M.A., F. García-Vallejo, S. Tomatsu, F. Cerón, C.J. Alméciga-Díaz, M.C. Domínguez, and L.A. Barrera. 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 (3): 448–59.
- Hagiwara, H., T. Aoki, and T. Yoshimi. 1995. “Immunoelectron Microscopic Analysis of Chondroitin Sulfates during Calcification in the Rat Growth Plate Cartilage.” *Histochemistry and Cell Biology* 103 (3): 213–20.
- Hall, Bradford, Andrew Cho, Advait Limaye, Kyoungin Cho, Jaspal Khillan, and Ashok B. Kulkarni. 2018. “Genome Editing in Mice Using CRISPR/Cas9 Technology.” *Current Protocols in Cell Biology* 81 (1): 1–31.
- Hamano, Kimiko, Masaharu Hayashi, Kei Shioda, Ryo Fukatsu, and Shuki Mizutani. 2008. “Mechanisms of Neurodegeneration in Mucopolysaccharidoses II and IIIB: Analysis of Human Brain Tissue.” *Acta Neuropathologica* 115 (5): 547–59.
- Hara, B P O, J P G Urban, and A Maroudas. 1990. “Influence of Cyclic Loading Articular Cartilage.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 49: 536–39.
- Harmatz, Paul R, Karl Eugen Mengel, Roberto Giugliani, Vassili Valayannopoulos, Shuan-Pei Lin, Rossella Parini, Nathalie Guffon, et al. 2014. “Longitudinal Analysis of Endurance and Respiratory Function from a Natural History Study of Morquio A Syndrome.” *Molecular Genetics and Metabolism* 114: 186–94.

Heimer, R, R Sporer, L Molinaro, L Hansen, and E Laposata. 1992. "Normal Human Synovial Fluid and Articular Cartilage Contain Similar Intact Proteoglycans." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 66 (6): 701–7.

Hendriksz, C.J., P. Harmatz, M. Beck, S. Jones, T. Wood, R. Lachman, C.G. Gravance, T. Orii, and S. Tomatsu. 2013. "Review of Clinical Presentation and Diagnosis of Mucopolysaccharidosis IVA C.J." *Mol Genet Metab* 110 (0): 54–64.

Hendriksz, Christian J., Roberto Giugliani, Paul Harmatz, Eugen Mengel, Nathalie Guffon, Vassili Valayannopoulos, Rossella Parini, et al. 2015. "Multi-Domain Impact of Elosufase Alfa in Morquio A Syndrome in the Pivotal Phase III Trial." *Molecular Genetics and Metabolism* 114 (2): 178–85.

Hendriksz, Christian J, Barbara Burton, Thomas R Fleming, Paul Harmatz, Derralynn Hughes, Simon A Jones, Shuan Pei Lin, 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." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 37 (6): 979–90.

Hille-rehfeld, Annette. 1995. "Mannose 6-Phosphate Receptors in Sorting and Transport of Lysosomal Enzymes" 1241: 177–94.

Hintze, Jonathan P., Shunji Tomatsu, Tadashi Fujii, Adriana M. Montaña, Seiji Yamaguchi, Yasuyuki Suzuki, Masaru Fukushi, Takeshi Ishimaru, and Tadao Orii. 2011. "Comparison of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Sandwich ELISA for Determination of Keratan Sulfate in Plasma and Urine." *Biomarker Insights* 6: 69–78.

Hoggan, M. D., N. R. Blacklow, and W. P. Rowe. 1966. "Studies of Small DNA Viruses Found in Various Adenovirus Preparations: Physical, Biological, and Immunological Characteristics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55 (6): 1467–74.

Ilyas, Imran, Syed Kashif, Samar Rabbani, and Husam A. Alrumaih. 2017. "Simultaneous Bilateral Total Hip Arthroplasty in Morquio Syndrome." *Arthroplasty Today* 3 (3): 144–46.

Im, D S, and N Muzyczka. 1992. "Partial Purification of Adeno-Associated Virus Rep78, Rep52, and Rep40 and Their Biochemical Characterization." *Journal of Virology* 66 (2): 1119–28.

International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs (ICORD). 2012. "The Yukiwariso Declaration."

Iyer, Vivek, Bin Shen, Wensheng Zhang, Alex Hodgkins, Thomas Keane, Xingxu Huang, and William C. Skarnes. 2015. "Off-Target Mutations Are Rare in Cas9-Modified Mice." *Nature Methods* 12 (6): 479.

James, Alison, Christian J. Hendriksz, and Owen Addison. 2011. "The Oral Health Needs of Children, Adolescents and Young Adults Affected by a Mucopolysaccharide Disorder." *JIMD Reports* 2: 51–58.

Jimenez, Veronica, Sergio Muñoz, Estefania Casana, Cristina Mallol, Ivet Elias, Claudia Jambrina, Albert Ribera, Tura Ferre, Sylvie Franckhauser, and Fatima Bosch. 2013. "In Vivo Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Genetic Engineering of White and Brown Adipose Tissue in Adult Mice." *Diabetes* 62 (12): 4012–22.

- Jomphe, Claudia, Mélanie Gabriac, Taben M Hale, Lucie Héroux, Louis-Eric Trudeau, Denis Deblois, Eulalia Montell, Josep Vergés, and Patrick du Souich. 2008. "Chondroitin Sulfate Inhibits the Nuclear Translocation of Nuclear Factor-KappaB in Interleukin-1beta-Stimulated Chondrocytes." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 102 (1): 59–65.
- Kampmann, Christoph, Tariq Abu-Tair, Seyfullah Gökce, Christina Lampe, Jörg Reinke, Eugen Mengel, Julia B. Hennermann, and Christiane M. Wiethoff. 2016. "Heart and Cardiovascular Involvement in Patients with Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio-A Syndrome)." *PLoS ONE* 11 (9): 1–12.
- Khaliq, Tanvir, Martin Sadilek, C Ronald Scott, Frantisek Turecek, and Michael H Gelb. 2011. "Tandem Mass Spectrometry for the Direct Assay of Lysosomal Enzymes in Dried Blood Spots: Application to Screening Newborns for Mucopolysaccharidosis IVA." *Clinical Chemistry* 57 (1): 128–31.
- Khan, Shaukat, Carlos J. Alméciga-Díaz, Kazuki Sawamoto, William G. Mackenzie, Mary C. Theroux, Christian Pizarro, Robert W. Mason, Tadao Orii, and Shunji Tomatsu. 2017. "Mucopolysaccharidosis IVA and Glycosaminoglycans." *Molecular Genetics and Metabolism* 120 (1–2): 78–95.
- Kleijer, W. J., G. C. Geilen, V. Garritsen, J. G.M. Huijmans, F. J. Los, Y. V. Voznyi, and O. P. Van Diggelen. 2000. "First-Trimester Diagnosis of Morquio Disease Type A." *Prenatal Diagnosis* 20 (3): 183–85.
- Koto, Atsuo, Allen L. Horwitz, Kinuko Suzuki, Carol W. Tiffany, and Kunihiro Suzuki. 1978. "The Morquio Syndrome: Neuropathology and Biochemistry." *Annals of Neurology* 4 (1): 26–36.
- Krusius, T., J. Finne, R. K. Margolis, and R. U. Margolis. 1986. "Identification of an O-Glycosidic Mannose-Linked Sialylated Tetrasaccharide and Keratan Sulfate Oligosaccharides in the Chondroitin Sulfate Proteoglycan of Brain." *Journal of Biological Chemistry* 261 (18): 8237–42.
- Kubaski, Francyne, Shunji Tomatsu, Pravin Patel, Tsutomu Shimada, Li Xie, Eriko Yasuda, Robert Mason, et al. 2015. "Non-Invasive Pulmonary Function Test on Morquio Patients." *Molecular Genetics and Metabolism* 115 (4): 186–92.
- Kurihara, Mana, Komei Kumagai, and Saburo Yagishita. 1996. "Sanfilippo Syndrome Type C: A Clinicopathological Autopsy Study of a Long-Term Survivor." *Pediatric Neurology* 14 (4): 317–21.
- Lai, Yi, Yongping Yue, and Dongsheng Duan. 2010. "Evidence for the Failure of Adeno-Associated Virus Serotype 5 to Package a Viral Genome $\geq 8.2\text{kb}$." *Molecular Therapy* 18 (1): 75–79.
- Larcher, Thibaut, Aude Lafoux, Laurent Tesson, Sé Verine Remy, Virginie Thepenier, Virginie François, Caroline Le Guiner, et al. 2014. "Characterization of Dystrophin Deficient Rats: A New Model for Duchenne Muscular Dystrophy." *PLoS ONE* 9 (10).
- Lavery, Christine, and Chris Hendriksz. 2014. "Mortality in Patients with Morquio Syndrome A." *JIMD Reports* 15: 59–66.
- Leadley, Regina M., Shona Lang, Kate Misso, Trudy Bekkering, Janine Ross, Takeyuki Akiyama, Michael Fietz, et al. 2014. "A Systematic Review of the Prevalence of Morquio A Syndrome: Challenges for Study Reporting in Rare

Diseases.” *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9: 173.

Lee, Jong Geol, Young Hoon Sung, and In Jeoung Baek. 2018. “Generation of Genetically-Engineered Animals Using Engineered Endonucleases.” *Archives of Pharmacal Research* 41 (9): 885–97.

Lentz, Thomas B., Steven J. Gray, and R. Jude Samulski. 2012. “Viral Vectors for Gene Delivery to the Central Nervous System.” *Neurobiology of Disease* 48 (2): 179–88.

Leone, Paola, David Shera, Scott W.J. McPhee, Jeremy S Francis, Edwin H Kolodny, Larissa T Bilaniuk, Dah Jyuu Wang, et al. 2012. “Long-Term Follow-up after Gene Therapy for Canavan Disease.” *Science Translational Medicine* 4 (165): 1–26.

Li, Yong, Ying Liu, Wei Xia, Dan Lei, John J. Voorhees, and Gary J. Fisher. 2013. “Age-Dependent Alterations of Decorin Glycosaminoglycans in Human Skin.” *Scientific Reports* 3.

Ling, Junxiu, S. A. Kincaid, G. R. McDaniel, J. E. Bartels, and B. Johnstone. 1996. “Immunohistochemical Study of a Chondroitin-6-Sulfate in Growth Plates of Broiler Chickens with High and Low Genetic Predispositions to Tibial Dyschondroplasia.” *Avian Diseases* 40 (1): 88.

Lock, Martin, Susan McGorray, Alberto Auricchio, Eduard Ayuso, E Jeffrey Beecham, Véronique Blouin-Tavel, Fatima Bosch, et al. 2010. “Characterization of a Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Reference Standard Material.” *Human Gene Therapy* 21 (10): 1273–85.

Lustmann, J. 1978. “Dentinoenamel Junction Area in Primary Teeth Affected by Morquio’s Syndrome.” *Journal of Dental Research* 57 (3): 475–79.

Maccari, F., N. C. Sorrentino, V. Mantovani, F. Galeotti, A. Fraldi, and N. Volpi. 2017. “Glycosaminoglycan Levels and Structure in a Mucopolysaccharidosis IIIA Mice and the Effect of a Highly Secreted Sulfamidase Engineered to Cross the Blood-Brain Barrier.” *Metabolic Brain Disease* 32 (1): 203–10.

Manno, Catherine S., Valder R. Arruda, Glenn F. Pierce, Bertil Glader, Margaret Ragni, John Rasko, Margareth C. Ozelo, et al. 2006. “Successful Transduction of Liver in Hemophilia by AAV-Factor IX and Limitations Imposed by the Host Immune Response.” *Nature Medicine* 12 (3): 342–47.

Marcó, Sara, Anna Pujol, Carles Roca, Sandra Motas, Albert Ribera, Miguel Garcia, Maria Molas, et al. 2016. “Progressive Neurologic and Somatic Disease in a Novel Mouse Model of Human Mucopolysaccharidosis Type IIIC.” *DMM Disease Models and Mechanisms* 9 (9): 999–1013.

Mashima, Ryuichi, Mari Ohira, Torayuki Okuyama, and Akiya Tatsumi. 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.” *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 14 (December 2017): 36–40.

Matern, Dietrich, Dimitar Gavrillov, Devin Oglesbee, Kimiyo Raymond, Piero Rinaldo, and Silvia Tortorelli. 2015. “Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders.” *Seminars in Perinatology* 39 (3): 206–16.

Mathiessen, Alexander, and Philip G. Conaghan. 2017. “Synovitis in Osteoarthritis: Current Understanding with Therapeutic Implications.” *Arthritis Research and*

Therapy 19 (1): 1–9.

Mejía, María Juliana Herrera. 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.

Mendell, Jerry R., S. Al-Zaidy, R. Shell, W. D. Arnold, L. R. Rodino-Klapac, T. W. Prior, L. Lowes, et al. 2017. "Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy." *New England Journal of Medicine* 377 (18): 1713–22.

Miller, Brad, Allan M. Sheppard, and Alan L. Pearlman. 1997. "Developmental Expression of Keratan Sulfate-like Immunoreactivity Distinguishes Thalamic Nuclei and Cortical Domains." *Journal of Comparative Neurology* 380 (4): 533–52.

Minami, Ryoji, Abo Katsuyuki, Kudoh Tooru, Tsugawa Satoshi, Oyanagi Kazuhiko, and Nakao Tooru. 1979. "Identification of Keratan Sulfate in Liver Affected by Morquio Syndrome." *Clinica Chimica Acta* 93 (2): 207–13.

Mingozzi, Federico, and Katherine A. High. 2011. "Therapeutic in Vivo Gene Transfer for Genetic Disease Using AAV: Progress and Challenges." *Nature Reviews Genetics* 12 (5): 341–55.

Mingozzi, Federico, Janneke J. Meulenberg, Daniel J. Hui, Etiena Basner-Tschakarjan, Nicole C. Hasbrouck, Shyrie A. Edmonson, Natalie A. Hutnick, 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 (10): 2077–86.

Mojica, Francisco J.M., and Lluís Montoliu. 2016. "On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals." *Trends in Microbiology* 24 (10): 811–20.

Montaño, A. M., K. Sukegawa, Z. Kato, R. Carrozzo, P. Di Natale, E. Christensen, K. O. Orii, T. Orii, N. Kondo, and S. Tomatsu. 2007. "Effect of 'Attenuated' Mutations in Mucopolysaccharidosis IVA on Molecular Phenotypes of N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 30 (5): 758–67.

Montaño, A. M., S. Tomatsu, G. S. Gottesman, M. Smith, and T. Orii. 2007. "International Morquio A Registry: Clinical Manifestation and Natural Course of Morquio A Disease." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 30 (2): 165–74.

Montaño, Adriana M., Shunji Tomatsu, Ana Brusius, Mary Smith, and Tadao Orii. 2008. "Growth Charts for Patients Affected with Morquio A Disease." *American Journal of Medical Genetics, Part A* 146 (10): 1286–95.

Montilla-García, Ángeles, Miguel Tejada, Gloria Perazzoli, José M. Entrena, Enrique Portillo-Salido, Eduardo Fernández-Segura, Francisco J. Cañizares, and Enrique J. Cobos. 2017. "Grip Strength in Mice with Joint Inflammation: A Rheumatology Function Test Sensitive to Pain and Analgesia." *Neuropharmacology* 125: 231–42.

Morrison, Sean J., and David T. Scadden. 2014. "The Bone Marrow Niche for Haematopoietic Stem Cells." *Nature* 505 (7483): 327–34.

Morrone, Amelia, Anna Caciotti, Robert Atwood, Kathryn Davidson, Chaoyi Du, Patricia Francis-Lyon, Paul Harmatz, et al. 2014. "Morquio a Syndrome-Associated Mutations: A Review of Alterations in the GALNS Gene and a New Locus-Specific Database." *Human Mutation* 35 (11): 1271–79.

Moscattello, D.K., Manoranjan Santra, D.M. Mann, D.J. McQuillan, A.J. Wong, and

- R.V. Iozzo. 1998. "Decorin Suppresses Tumor Cell Growth by Activating the Epidermal Growth Factor Receptor." *J Clin Invest* 101 (2): 406–12.
- Mossman, Jean, and A. D. Patrick. 1982. "Prenatal Diagnosis of Mucopolysaccharidosis by Two-Dimensional Electrophoresis of Amniotic Fluid Glycosaminoglycans." *Prenatal Diagnosis* 2 (3): 169–76.
- Motas, Sandra, Virginia Haurigot, Miguel Garcia, Sara Marcó, Albert Ribera, Carles Roca, Xavier Sánchez, et al. 2016. "CNS-Directed Gene Therapy for the Treatment of Neurologic and Somatic Mucopolysaccharidosis Type II (Hunter Syndrome)." *JCI Insight* 1 (9): 1–18.
- Mourão, Paulo A.S. 1988. "Distribution of Chondroitin 4–Sulfate and Chondroitin 6–Sulfate in Human Articular and Growth Cartilage." *Arthritis & Rheumatism* 31 (8): 1028–33.
- Muenzer, Joseph. 2011. "Overview of the Mucopolysaccharidoses." *Rheumatology* 50 (5): 4–12.
- Muir. 1969. "Mucopolysaccharides and Metabolism of the of and the Problem." *American Journal of Medicine* 47: 673–90.
- Murrey, Darren A., Bartholomew J. Naughton, F. Jason Duncan, Aaron S. Meadows, Tierra A. Ware, Katie J. Campbell, William G. Bremer, et al. 2014. "Feasibility and Safety of Systemic RAAV9-HNAGLU Delivery for Treating Mucopolysaccharidosis IIIB: Toxicology, Biodistribution, and Immunological Assessments in Primates." *Human Gene Therapy Clinical Development* 25 (2): 72–84.
- Nagao, Kyoko, Thierry Morlet, Elizabeth Haley, Jennifer Padilla, Julianne Nemith, Robert W. Mason, and Shunji Tomatsu. 2018. "Neurophysiology of Hearing in Patients with Mucopolysaccharidosis Type IV." *Molecular Genetics and Metabolism* 123 (4): 472–78.
- Naldini, Luigi. 2015. "Gene Therapy Returns to Centre Stage." *Nature* 526 (7573): 351–60.
- Nash, K., W. Chen, and N. Muzyczka. 2008. "Complete In Vitro Reconstitution of Adeno-Associated Virus DNA Replication Requires the Minichromosome Maintenance Complex Proteins." *Journal of Virology* 82 (3): 1458–64.
- Nathwani, Amit C., Cecilia Rosales, Jenny McIntosh, Ghasem Rastegarlar, Devhnut Nathwani, Deepak Raj, Sushmita Nawathe, 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." *Molecular Therapy* 19 (5): 876–85.
- Nelson, J., D. Broadhead, and Jean Mossman. 1988. "Clinical Findings in 12 Patients with MPS IV A (Morquio's Disease): Further Evidence for Heterogeneity. Part I: Clinical and Biochemical Findings." *Clinical Genetics* 33 (2): 111–20.
- Neufeld, Elizabeth F, and Joseph Muenzer. 2001. "The Mucopolysaccharidoses." Edited by Scriver CR. *Lysosomal Disorders*.
- Nieduszynski, I. A., T. N. Huckerby, J. M. Dickenson, G. M. Brown, T. Gui-Hua, and M. T. Bayliss. 1990. "Structural Aspects of Skeletal Keratan Sulphates." *Biochemical Society Transactions* 18 (5): 792–93.
- Olarte-Avellaneda, Sergio, Alexander Rodríguez-López, Carlos Javier Alméciga-

- Díaz, and Luis Alejandro Barrera. 2014. "Computational Analysis of Human N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase Enzyme: An Update in Genotype–Phenotype Correlation for Morquio A." *Molecular Biology Reports* 41 (11): 7073–88.
- Osborn, Mark J., Ron T. McElmurry, Christopher J. Lees, Anthony P. Defeo, Zhi Ying Chen, Mark A. Kay, Luigi Naldini, Gordon Freeman, Jakub Tolar, and Bruce R. Blazar. 2011. "Minicircle DNA-Based Gene Therapy Coupled with Immune Modulation Permits Long-Term Expression of α -L-Iduronidase in Mice with Mucopolysaccharidosis Type I." *Molecular Therapy* 19 (3): 450–60.
- Peracha, Hira, Kazuki Sawamoto, Lauren Averill, Heidi Kecskemethy, Mary Theroux, Mihir Thacker, Kyoko Nagao, et al. 2018. "Molecular Genetics and Metabolism, Special Edition: Diagnosis, Diagnosis and Prognosis of Mucopolysaccharidosis IVA." *Molecular Genetics and Metabolism* 125 (1–2): 18–37.
- Pizarro, Christian, Ryan R. Davies, Mary Theroux, Ellen A. Spurrier, Lauren W. Averill, and Shunji Tomatsu. 2016. "Surgical Reconstruction for Severe Tracheal Obstruction in Morquio A Syndrome." *Annals of Thoracic Surgery* 102 (4): e329–31.
- Platt, Frances M, Alessandra D’Azzo, Beverly L Davidson, Elizabeth F Neufeld, and Cynthia J Tiff. 2018. "Lysosomal Storage Diseases." *Nature Reviews. Disease Primers* 4 (1): 27.
- Przybilla, Michael J., Li Ou, Alexandru Flaviu Tăbăran, Xuntian Jiang, Rohini Sidhu, Pamela J. Kell, Daniel S. Ory, M. Gerard O’Sullivan, and Chester B. Whitley. 2019. "Comprehensive Behavioral and Biochemical Outcomes of Novel Murine Models of GM1-Gangliosidosis and Morquio Syndrome Type B." *Molecular Genetics and Metabolism* 126 (2): 139–50.
- Pshezhetsky, Alexey V., and Michel Potier. 1996. "Association of N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase with the Multienzyme Lysosomal Complex of β -Galactosidase, Cathepsin A, and Neuraminidase: Possible Implication for Intralysosomal Catabolism of Keratan Sulfate." *Journal of Biological Chemistry* 271 (45): 28359–65.
- Qubbaj, Wafa, Aida I. Al-Aqeel, Zuhair Al-Hassnan, Adel Al-Duraihim, Khalid Awartani, Rafat Al-Rejjal, and Serdar Coskun. 2008. "Preimplantation Genetic Diagnosis of Morquio Disease." *Prenatal Diagnosis* 28 (10): 900–903.
- Rabinowitz, J. E., F. Rolling, C. Li, H. Conrath, W. Xiao, X. Xiao, and R. J. Samulski. 2002. "Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity." *Journal of Virology* 76 (2): 791–801.
- Rastall, David, and Andrea Amalfitano. 2015. "Recent Advances in Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders." *Application of Clinical Genetics* 8: 157–69.
- Rastall, David P.W., and Andrea Amalfitano. 2017. "Current and Future Treatments for Lysosomal Storage Disorders." *Current Treatment Options in Neurology* 19 (12).
- Ratjen, Felix, and Gerd Döring. 2003. "Cystic Fibrosis." *The Lancet* 361: 681–89.
- Ribera, Albert, Virginia Haurigot, Miguel Garcia, Sara Marcó, Sandra Motas, Pilar Villacampa, Luca Maggioni, et al. 2015. "Biochemical, Histological and Functional Correction of Mucopolysaccharidosis Type IIIB by Intra-Cerebrospinal Fluid Gene Therapy." *Human Molecular Genetics* 24 (7): 2078–95.
- Rivera-Colón, Yadilette, Emily K Schutsky, Adriana Z Kita, and Scott C Garman.

2012. "The Structure of Human GALNS Reveals the Molecular Basis for Mucopolysaccharidosis IV A." *Journal of Molecular Biology* 423 (5): 736–51.

Roca, Alfredo, and Germán Castañeda. 2005. "Metabolismo Óseo En Fisiología Endocrina." In *Fisiología Endocrina*, Third. Bogotá.

Rodríguez-López, Alexander, Carlos J. Alméciga-Díaz, Jhonnathan Sánchez, Jefferson Moreno, Laura Beltran, Dennis Díaz, Andrea Pardo, et al. 2016. "Recombinant Human N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase (GALNS) Produced in the Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris*." *Scientific Reports* 6 (July): 1–13.

Rodríguez, Alexander, Ángela J. Espejo, Alejandra Hernández, Olga L. Velásquez, Lina M. Lizaraso, Henry A. Córdoba, Oscar F. Sánchez, Carlos J. Alméciga-Díaz, and Luis A. Barrera. 2010. "Enzyme Replacement Therapy for Morquio A: An Active Recombinant N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase Produced in *Escherichia Coli* BL21." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37 (11): 1193–1201.

Rowan, Daniel J., Shunji Tomatsu, Jeffrey H. Grubb, Adriana M. Montañó, and William S. Sly. 2013. "Assessment of Bone Dysplasia by Micro-CT and Glycosaminoglycan Levels in Mouse Models for Mucopolysaccharidosis Type I, IIIA, IVA, and VII." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 36 (2): 235–46.

Ruzo, Albert, Miquel Garcia, Albert Ribera, Pilar Villacampa, Virginia Haurigot, Sara Marcó, Eduard Ayuso, et al. 2012. "Liver Production of Sulfamidase Reverses Peripheral and Ameliorates CNS Pathology in Mucopolysaccharidosis IIIA Mice." *Molecular Therapy* 20 (2): 254–66.

Ruzo, Albert, Sara Marcó, Miquel García, Pilar Villacampa, Albert Ribera, Eduard Ayuso, Lucca Maggioni, Federico Mingozzi, Virginia Haurigot, and Fatima Bosch. 2012. "Correction of Pathological Accumulation of Glycosaminoglycans in Central Nervous System and Peripheral Tissues of MPSIIIA Mice through Systemic AAV9 Gene Transfer." *Human Gene Therapy* 23 (12): 1237–46.

Saftig, Paul, and Judith Klumperman. 2009. "Lysosome Biogenesis and Lysosomal Membrane Proteins: Trafficking Meets Function." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (9): 623–35.

Saika, Shizuya, Takeshi Miyamoto, Sai Ichi Tanaka, Takeshi Tanaka, Iku Ishida, Yoshitaka Ohnishi, Akira Ooshima, et al. 2003. "Response of Lens Epithelial Cells to Injury: Role of Lumican in Epithelial-Mesenchymal Transition." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44 (5): 2094–2102.

Salazar, Diego A., Alexander Rodríguez-López, Angélica Herreño, Hector Barbosa, Juliana Herrera, Andrea Ardila, George E. Barreto, Janneth González, and Carlos J. Alméciga-Díaz. 2016. "Systems Biology Study of Mucopolysaccharidosis Using a Human Metabolic Reconstruction Network." *Molecular Genetics and Metabolism* 117 (2): 129–39.

Samulski, R. J., K. I. Berns, M. Tan, and N. Muzyczka. 1982. "Cloning of Adeno-Associated Virus into PBR322: Rescue of Intact Virus from the Recombinant Plasmid in Human Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (6 I): 2077–81.

Samulski, R. Jude, and Nicholas Muzyczka. 2014. "AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes." *Annual Review of Virology* 1 (1): 427–51.

- Sánchez, Víctor. 2018. "Desarrollo de Una Estrategia de Terapia Génica Para El Tratamiento de La Mucopolisacaridosis Tipo IVA (Morquio A)." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 41 (1): 115–25.
- Sands, Mark S. 2011. "AAV-Mediated Liver-Directed Gene Therapy." *Methods in Molecular Biology* 807: 141–57.
- Sanford, Mark, and Jin Han Lo. 2014. "Elosulfase Alfa: First Global Approval." *Drugs* 74 (6): 713–18.
- Santana Sarmiento, Dmitry José De, Sérgio Henrique Gonçalves De Carvalho, Saulo Leonardo Sousa Melo, Fátima Roneiva Alves Fonseca, Denise Nóbrega Diniz, Patrícia Meira Bento, Germana De Queiroz Tavares Borges Mesquita, and Daniela Pita De Melo. 2015. "Mucopolysaccharidosis: Radiographic Findings in a Series of 16 Cases." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 120 (6): e240–46.
- Sardiello, Marco, Michela Palmieri, Alberto di Ronza, Diego Luis Medina, Marta Valenza, Vincenzo Alessandro Gennarino, Chiara Di Malta, et al. 2009. "A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function," 473–78.
- Sawamoto, Kazuki, Hui Hsuan Chen, Carlos J. Alméciga-Díaz, Robert W. Mason, and Shunji Tomatsu. 2018. "Gene Therapy for Mucopolysaccharidoses." *Molecular Genetics and Metabolism* 123 (2): 59–68.
- Sawamoto, Kazuki, Yasuyuki Suzuki, William G. Mackenzie, Mary C. Theroux, Christian Pizarro, Hiromasa Yabe, Kenji E. Orii, Robert W. Mason, Tadao Orii, and Shunji Tomatsu. 2016. "Current Therapies for Morquio A Syndrome and Their Clinical Outcomes." *Expert Opinion on Orphan Drugs* 4 (9): 941–51.
- Schiffmann, Raphael, Edmond J Fitzgibbon, Chris Harris, Catherine DeVile, Elin H Davies, Larry Abel, Ivo N van Schaik, et al. 2008. "Randomized, Controlled Trial of Miglustat in Gaucher's Disease Type 3." *Annals of Neurology* 64 (5): 514–22.
- Schnepp, Bruce C, Ryan L Jensen, C.-L. Chen, Philip R Johnson, and K Reed Clark. 2005. "Characterization of Adeno-Associated Virus Genomes Isolated from Human Tissues." *Journal of Virology* 79 (23): 14793–803.
- Schueler, U H, T Kolter, C R Kaneski, G C Zirzow, K Sandhoff, and R O Brady. 2004. "Correlation between Enzyme Activity and Substrate Storage in a Cell Culture Model System for Gaucher Disease." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 27 (5): 649–58.
- Schultz, Brian R, and Jeffrey S Chamberlain. 2008. "Recombinant Adeno-Associated Virus Transduction and Integration." *Molecular Therapy* 16 (12): 2103–12.
- Schuster, Daniel J., Jaclyn A. Dykstra, Maureen S. Riedl, Kelley F. Kitto, Lalitha R. Belur, R. Scott McIvor, Robert P. Elde, Carolyn A. Fairbanks, and Lucy Vulchanova. 2014. "Biodistribution of Adeno-Associated Virus Serotype 9 (AAV9) Vector after Intrathecal and Intravenous Delivery in Mouse." *Frontiers in Neuroanatomy* 8 (JUN): 1–14.
- Schweighardt, Becky, Troy Tompkins, Kelly Lau, Lynne Jesaitis, Yulan Qi, Donald G. Musson, Pamela Farmer, 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." *Clinical Therapeutics* 37 (5): 1012-1021.e6.
- Settembre, Carmine, Alessandro Fraldi, Diego L Medina, Andrea Ballabio, and Texas Children. 2013. "Signals from the Lysosome" 14 (5): 283–96.

- Shimada, Tsutomu, Shunji Tomatsu, Robert W Mason, Eriko Yasuda, William G Mackenzie, Jobayer Hossain, Yuniko Shibata, et al. 2015. "Di-Sulfated Keratan Sulfate as a Novel Biomarker for Mucopolysaccharidosis II, IVA, and IVB." *JIMD Reports* 21: 1–13.
- Shimada, Tsutomu, Shunji Tomatsu, Eriko Yasuda, Robert W Mason, William G Mackenzie, Yuniko Shibata, Francyne Kubaski, et al. 2014. "Chondroitin 6-Sulfate as a Novel Biomarker for Mucopolysaccharidosis IVA and VII." *JIMD Reports* 16: 15–24.
- Simmons, M. A., I. A. Bruce, S. Penney, E. Wraith, and M. P. Rothera. 2005. "Otorhinolaryngological Manifestations of the Mucopolysaccharidoses." *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 69 (5): 589–95.
- Singh, Jagat, Nicola Di Ferrante, Paul Niebes, and Daniela Tavella. 1976. "N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase in Man." *Journal of Clinical Investigation* 57 (December 1975): 1036–40.
- Smith, Sara E., Anna Potier, Joe Trometer, Yueng Tsun Au, Jim DiPerna, Alyssa Vranish, and Michael Gelb. 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*, 64–65.
- Spurlock, Katherine, Brenda Diethelm-Okita, Ashley Schneider, Kelly King, Leigh Charvet, Sarah Lewis, Chester B. Whitley, and Julie Eisengart. 2019. "Evidence of Attention Problems in Morquio Syndrome." *Molecular Genetics and Metabolism* 126 (2): S137.
- Srivastava, C. H., R. J. Samulski, L. Lu, S. H. Larsen, and A. Srivastava. 1989. "Construction of a Recombinant Human Parvovirus B19: Adeno-Associated Virus 2 (AAV) DNA Inverted Terminal Repeats Are Functional in a AAV-B19 Hybrid Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (20): 8078–82.
- Sukegawa, K. 2000. "Biochemical and Structural Analysis of Missense Mutations in N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase Causing Mucopolysaccharidosis IVA Phenotypes." *Human Molecular Genetics* 9 (9): 1283–90.
- Tamagawa, Kimiko, Yoshio Morimatsu, Kohshiro Fujisawa, Atsushi Hara, and Tamotsu Taketomi. 1985. "Neuropathological Study and Chemico-Pathological Correlation in Sibling Cases of Sanfilippo Syndrome Type B." *Brain and Development* 7 (6): 599–609.
- Tan, Guak-Kim, and Yasuhiko Tabata. 2014. "Chondroitin-6-Sulfate Attenuates Inflammatory Responses in Murine Macrophages via Suppression of NF-KB Nuclear Translocation." *Acta Biomaterialia* 10 (6): 2684–92.
- Taylor, Kristen R., and Richard L. Gallo. 2006. "Glycosaminoglycans and Their Proteoglycans: Host-Associated Molecular Patterns for Initiation and Modulation of Inflammation." *FASEB Journal* 20 (1): 9–22.
- Tessitore, Alessandra, Armida Faella, Thomas O'Malley, Gabriella Cotugno, Monica Doria, Tetsuo Kunieda, Giuseppe Matarese, Mark Haskins, and Alberto Auricchio. 2008. "Biochemical, Pathological, and Skeletal Improvement of Mucopolysaccharidosis VI after Gene Transfer to Liver but Not to Muscle." *Molecular Therapy* 16 (1): 30–37.

- Testa, Francesco, Albert M. Maguire, Settimio Rossi, Eric A. Pierce, Paolo Melillo, Kathleen Marshall, Sandro Banfi, 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 (6): 1283–91.
- Theroux, Mary C., Tanvi Nerker, Colleen Ditro, and William G. MacKenzie. 2012. "Anesthetic Care and Perioperative Complications of Children with Morquio Syndrome." *Paediatric Anaesthesia* 22 (9): 901–7.
- Toietta, G., G. M. Severini, C. Traversari, S. Tomatsu, K. Sukegawa, S. Fukuda, N. Kondo, P. Tortora, and C. Bordignon. 2001. "Various Cells Retrovirally Transduced with N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase Correct Morquio Skin Fibroblasts in Vitro." *Human Gene Therapy* 12 (16): 2007–16.
- Tollersrud, Greiner, and Thomas Berg. 2005. "Lysosomal Storage Disorders." In *Lysosomes*, 60–73. Landes Bioscience.
- Tomatsu, S., Seiji Fukuda, Masue Michiya, Kazuko Sukegawa, Toshiyuki Fukao, Atsushi Yamagishi, Toshinori Horil, et al. 1991. "Morquio Disease: Isolation, Characterization and Expression of Full-Length CDNA for Human n-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase" 15 (1): 677–83.
- Tomatsu, S., A M. Montano, H Oikawa, Daniel J. Rowan, M Smith, L Barrera, Y Chinen, et al. 2011. "Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Disease): Clinical Review and Current Treatment: A Special Review." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12 (6): 931–45.
- Tomatsu, Shunji, Carlos J. Alméciga-Díaz, Adriana M. Montaña, Hiromasa Yabe, Akemi Tanaka, Vu Chi Dung, Roberto Giugliani, et al. 2015. "Therapies for the Bone in Mucopolysaccharidoses." *Molecular Genetics and Metabolism* 114 (2): 94–109.
- Tomatsu, Shunji, Lauren W Averill, Kazuki Sawamoto, William G Mackenzie, Michael B Bober, Christian Pizarro, Christopher J Goff, Li Xie, and Tadao Orii. 2016. "Obstructive Airway in Morquio A Syndrome, the Past, the Present and the Future." *Mol Genet Metab* 117 (2): 150–56.
- Tomatsu, Shunji, Caitlin Doherty, and Molly Stapleton. 2019. "Effect of Enzyme Replacement Therapy on the Growth of Patients with Morquio Syndrome Type A." *Molecular Genetics and Metabolism* 126 (2): S144.
- Tomatsu, Shunji, Monica Gutierrez, Tatsuo Nishioka, Masamichi Yamada, Mana Yamada, Yasuhiro Tosaka, Jeffrey H. Grubb, et al. 2005. "Development of MPS IVA Mouse (Galnstm(HC79S-mC76S)Slu) Tolerant to Human N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase." *Human Molecular Genetics* 14 (22): 3321–35.
- Tomatsu, Shunji, Adriana M. Montaña, Monica Gutierrez, Jeffrey H. Grubb, Hirotaka Oikawa, Vu Chi Dung, Amiko Ohashi, et al. 2007. "Characterization and Pharmacokinetic Study of Recombinant Human N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase." *Molecular Genetics and Metabolism* 91 (1): 69–78.
- Tomatsu, Shunji, Adriana M. Montaña, Tatsuo Nishioka, Monica A. Gutierrez, Olga M. Peña, Georgeta G. Trandafirescu, Patricia Lopez, Seiji Yamaguchi, Akihiko Noguchi, and Tadao Orii. 2005. "Mutation and Polymorphism Spectrum of the GALNS Gene in Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A)." *Human Mutation* 26 (6): 500–512.
- Tomatsu, Shunji, Adriana M. Montaña, Toshihiro Oguma, Vu Chi Dung, Hirotaka

Oikawa, Talita Giacomet De Carvalho, María L. Gutiérrez, et al. 2010. "Validation of Keratan Sulfate Level in Mucopolysaccharidosis Type IVA by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33 (3).

Tomatsu, Shunji, Adriana M. Montaña, Amiko Ohashi, Monica A. Gutierrez, Hirotaka Oikawa, Toshihiro Oguma, Vu Chi Dung, Tatsuo Nishioka, Tadao Orii, and William S. Sly. 2008. "Enzyme Replacement Therapy in a Murine Model of Morquio A Syndrome." *Human Molecular Genetics* 17 (6): 815–24.

Tomatsu, Shunji, Adriana M Montaña, Hirotaka Oikawa, Vu Chi Dung, Amiko Hashimoto, Toshihiro Oguma, Monica L Gutiérrez, et al. 2015. "Enzyme Replacement Therapy in Newborn Mucopolysaccharidosis IVA Mice: Early Treatment Rescues Bone Lesions?" *Molecular Genetics and Metabolism* 114 (2): 195–202.

Tomatsu, Shunji, Adriana M. Montão, Vu Chi Dung, Amiko Ohashi, Hirotaka Oikawa, Toshihiro Oguma, Tadao Orii, Luis Barrera, and William S. Sly. 2010. "Enhancement of Drug Delivery: Enzyme-Replacement Therapy for Murine Morquio a Syndrome." *Molecular Therapy* 18 (6): 1094–1102.

Tomatsu, Shunji, Koji O. Orii, Carole Vogler, Jun Nakayama, Beth Levy, Jeffrey H. Grubb, Monica A. Gutierrez, 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." *Human Molecular Genetics* 12 (24): 3349–58.

Tomatsu, Shunji, Kazuki Sawamoto, Tokiko Sakai, Ikue Kitazawa, Hideyuki Futatsumori, and Takehiko Nakamura. 2018. "Substrate Degradation Enzyme Therapy (SDET) for Mucopolysaccharidosis Type IVA." *Molecular Genetics and Metabolism* 123 (2): S140.

Tomatsu, Shunji, Kazuki Sawamoto, Tsutomu Shimada, Michael B. Bober, Francyne Kubaski, Eriko Yasuda, Robert W. Mason, et al. 2015. "Enzyme Replacement Therapy for Treating Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio A Syndrome): Effect and Limitations." *Expert Opinion on Orphan Drugs* 3 (11): 1279–90.

Tomatsu, Shunji, Carole Vogler, Adriana M. Montaña, Monica Gutierrez, Hirotaka Oikawa, Vu Chi Dung, Tadao Orii, Akihiko Noguchi, and William S. Sly. 2007. "Murine Model (Galns^{Tm(C76S)Slu}) of MPS IVA with Missense Mutation at the Active Site Cysteine Conserved among Sulfatase Proteins." *Molecular Genetics and Metabolism* 91 (3): 251–58.

Tomatsu, Shunji, Eriko Yasuda, Pravin Patel, Kristen Ruhnke, Tsutomu Shimada, Carlos J Alméjiga-díaz, Luis A Barrera, et al. 2014. "Morquio A Syndrome: Diagnosis and Current and Future Therapies" 12 (0 1): 141–51.

Tsai, Shengdar Q, Nhu T Nguyen, Jose Malagon-lopez, Ved V Topkar, Martin J Aryee, J Keith Joung, Pathology Unit, et al. 2017. "CIRCLE-Seq: A Highly Sensitive in Vitro Screen for Genome-Wide CRISPR-Cas9 Nuclease off-Targets" 14 (6): 607–14.

Wang, Jianmin, Zuo Luan, Hua Jiang, Jianpei Fang, Maoquan Qin, Vincent Lee, and Jing Chen. 2016. "Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Thirty-Four Pediatric Cases of Mucopolysaccharidosis—A Ten-Year Report from the China Children Transplant Group." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 22 (11): 2104–8.

- Ward, Natalie J., Suzanne M.K. Buckley, Simon N. Waddington, Thierry VandenDriessche, Marinee K.L. Chuah, Amit C. Nathwani, Jenny McIntosh, et al. 2011. "Codon Optimization of Human Factor VIII CDNAs Leads to High-Level Expression." *Blood* 117 (3): 798–807.
- Watson Levings, Rachael S., Ted A. Broome, Andrew D. Smith, Brett L. Rice, Eric P. Gibbs, David A. Myara, E. Viktoria Hyddmark, et al. 2018. "Gene Therapy for Osteoarthritis: Pharmacokinetics of Intra-Articular Self-Complementary Adeno-Associated Virus Interleukin-1 Receptor Antagonist Delivery in an Equine Model." *Human Gene Therapy Clinical Development* 29 (2): 90–100.
- Weidemann, Frank, Markus Niemann, Frank Breunig, Sebastian Herrmann, Meinrad Beer, Stefan Störk, Wolfram Voelker, Georg Ertl, Christoph Wanner, and Jörg Strotmann. 2009. "Long-Term Effects of Enzyme Replacement Therapy on Fabry Cardiomyopathy. Evidence for a Better Outcome with Early Treatment." *Circulation* 119 (4): 524–29.
- Wet, J R de, Keith V Wood, M de Luca, Donald R Helinski, and S Subramani. 1987. "Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells." *Molecular Cell Biology* 7 (2): 725–37.
- Whitley, C B, M D Ridnour, K A Draper, C M Dutton, and J P Neglia. 1989. "Diagnostic Test for Mucopolysaccharidosis. I. Direct Method for Quantifying Excessive Urinary Glycosaminoglycan Excretion." *Clinical Chemistry* 35 (3): 374–79.
- Wilcox, William R. 2004. "Lysosomal Storage Disorders: The Need for Better Pediatric Recognition and Comprehensive Care." *Journal of Pediatrics* 144 (5).
- Wilson, Laurence O.W., Sara Hetzel, Christopher Pockrandt, Knut Reinert, and Denis C. Bauer. 2019. "VARSCOT: Variant-Aware Detection and Scoring Enables Sensitive and Personalized off-Target Detection for CRISPR-Cas9." *BMC Biotechnology* 19 (1): 1–7.
- Wolfe, Brian J., Sophie Blanchard, Martin Sadilek, C. Ronald Scott, Frantisek Turecek, and Michael H. Gelb. 2011. "Tandem Mass Spectrometry for the Direct Assay of Lysosomal Enzymes in Dried Blood Spots: Application to Screening Newborns for Mucopolysaccharidosis II (Hunter Syndrome)." *Analytical Chemistry* 83 (3): 1152–56.
- Wu, Zhijian, Hongyan Yang, and Peter Colosi. 2010. "Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging." *Molecular Therapy* 18 (1): 80–86.
- Xu, Haoxing, and Dejian Ren. 2015. "Lysosomal Physiology Haoxing." *Annu Rev Physiol.* 344 (77): 57–88.
- Yabe, Hiromasa, Akemi Tanaka, Yasutsugu Chinen, Shunichi Kato, Kazuki Sawamoto, Eriko Yasuda, Haruo Shintaku, Yasuyuki Suzuki, Tadao Orii, and Shunji Tomatsu. 2016. "Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Morquio A Syndrome." *Molecular Genetics and Metabolism* 117 (2): 84–94.
- Yamakoshi, Yasuo, Jan C.C. Hu, Shengxi Liux, Xiaoling Sun, Chuhua Zhang, Shinichiro Oida, Makato Fukae, and James P. Simmer. 2002. "Porcine N-Acetylgalactosamine 6-Sulfatase (GALNS) CDNA Sequence and Expression in Developing Teeth." *Connective Tissue Research* 43 (2–3): 167–75.
- Yangzi, Jiang, and Rocky S. Tuan. 2015. "Origin and Function of Cartilage Stem/Progenitor Cells in Osteoarthritis." *Physiology & Behavior* 176 (4): 139–48.

Yasuda, Eriko, Kazunari Fushimi, Yasuyuki Suzuki, Katsuji Shimizu, Tsuyoshi Takami, Jozef Zustin, Pravin Patel, et al. 2013. "Pathogenesis of Morquio A Syndrome: An Autopsied Case Reveals Systemic Storage Disorder." *Molecular Genetics and Metabolism* 109 (3): 301–11.

Zanta-Boussif, M. A., S. Charrier, A. Brice-Ouzet, S. Martin, P. Opolon, A. J. Thrasher, T. J. Hope, and A. Galy. 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 Therapy* 16 (5): 605–19.

Zhang, Haoqian, Kenji Uchimura, and Kenji Kadomatsu. 2006. "Brain Keratan Sulfate and Glial Scar Formation." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1086: 81–90.

Zhang, Yuntao, Abigail H. Conrad, Elena S. Tasheva, Ke An, Lolita M. Corpuz, Yutaka Kariya, Kiyoshi Suzuki, and Gary W. Conrad. 2005. "Detection and Quantification of Sulfated Disaccharides from Keratan Sulfate and Chondroitin/Dermatan Sulfate during Chick Corneal Development by ESI-MS/MS." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46 (5): 1604–14.

Zhao, H., O. P. Van Diggelen, R. Thoomes, J. Huumans, E. Young, T. Mazurczak, and W. J. Kleijer. 1990. "Prenatal Diagnosis of Morquio Disease Type a Using a Simple Fluorometric Enzyme Assay." *Prenatal Diagnosis* 10 (2): 85–91.

Ziaei, Mohammed, Jie Zhang, Dipika V. Patel, and Charles N.J. McGhee. 2017. "Umbilical Cord Stem Cells in the Treatment of Corneal Disease." *Survey of Ophthalmology* 62 (6): 803–15.