



Universidad  
Francisco de Vitoria  
**UFV** Madrid  
*Escuela de Postgrado y  
Formación Permanente*

# **Aplicación de células madre mesenquimales modificadas genéticamente para el tratamiento de la enfermedad de Sanfilippo tipo A**

Máster en Terapias Avanzadas en Biomedicina

**Autores:** Francisco García Giménez, María José Martínez Martínez,  
Sofía Martínez Rodríguez y Andrea Peña López

**Tutora:** M. Cristina Sánchez Martínez

**Asignatura:** Proyectos innovadores

Madrid, febrero 2022

<b>1</b>	<b><i>Introducción</i></b>	<b>1</b>
1.1	<b>Fisiopatología</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Clínica</b>	<b>3</b>
1.3	<b>Diagnóstico</b>	<b>4</b>
1.4	<b>Tratamientos</b>	<b>5</b>
1.5	<b>Células madre mesenquimales</b>	<b>10</b>
1.5.1	Capacidad inmunomoduladora	10
1.5.2	Efecto sobre el SNC	12
1.5.3	Biodistribución	13
1.5.4	Corrección cruzada	14
1.5.5	MSCs y vectores AAVs	14
1.6	<b>Propuesta</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b><i>Diseño experimental</i></b>	<b>16</b>
2.1	<b>Obtención y caracterización de las MSCs</b>	<b>16</b>
2.1.1	Características de las MSCs	16
2.2	<b>Vector AAV</b>	<b>19</b>
2.2.1	Diseño del constructo	19
2.2.2	Producción del vector viral	21
a.	Purificación y concentración	22
b.	Titulación viral	22
2.2.3	Transducción de MSCs con vectores AAV	23
<b>3</b>	<b><i>Ensayos in vitro</i></b>	<b>23</b>
3.1	<b>Estudios de expresión de proteína</b>	<b>23</b>
3.2	<b>Ensayos de corrección cruzada</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b><i>Estudios in vivo</i></b>	<b>27</b>
4.1	<b>Modelo animal de roedor</b>	<b>28</b>
4.1.1	Administración de las células mesenquimales vía intranasal	29
a)	Ensayo de tropismo	30
b)	Ensayo de dosis- eficacia- toxicidad	32
4.1.2	Administración de las células mesenquimales vía intravenosa	34
a)	Ensayo de tropismo	34
b)	Ensayo de dosis- eficacia- toxicidad	35
<b>5</b>	<b><i>Ensayo preclínico</i></b>	<b>37</b>
5.1	<b>Ratones</b>	<b>37</b>
5.2	<b>Modelo animal superior</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b><i>Ensayo Clínico</i></b>	<b>45</b>
6.1	<b>Ensayo 1: administración intranasal</b>	<b>45</b>
6.2	<b>Ensayo 2: administración combinada intranasal-intravenosa.</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b><i>Discusión</i></b>	<b>52</b>

<b>8</b>	<b><i>Conclusiones</i></b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b><i>Bibliografía</i></b>	<b>55</b>

## Resumen

El Síndrome de Sanfilippo es un tipo de mucopolisacaridosis caracterizada por la deficiencia enzimática. Concretamente, la sulfamidasa es la enzima implicada en el proceso patológico del Síndrome de Sanfilippo tipo A y es en este subtipo en el que se centra este trabajo de investigación. Los tratamientos existentes hasta la fecha no tienen la capacidad curativa, por lo que se establece el desarrollo de tratamientos alternativos más eficaces como una necesidad de urgencia sanitaria.

En este estudio se propone el tratamiento con células madre mesenquimales transducidas con vectores virales adenoasociados para la sobreexpresión de la sulfamidasa. La estrategia está basada en varias aproximaciones. Por un lado, la propia capacidad inmunomoduladora de estas células madre unido a su tropismo dirigido a inflamación ayuda con este aspecto de la enfermedad. Además, proporcionan neuroprotección y promueven la regeneración neuronal en el sistema nervioso central. Por último, la expresión del transgén terapéutico ayuda a mejorar los niveles de glicosaminoglicanos acumulados como consecuencia de la enfermedad debido al proceso de corrección cruzada.

Tales propiedades demuestran el gran potencial de la terapia propuesta, administrada de forma intranasal para actuar sobre tejido nervioso y/o forma intravenosa para actuar de manera sistémica. Dependiendo de la gravedad de la enfermedad, íntimamente relacionada con la edad del paciente, se procedería a administrar únicamente la forma intranasal (formas leves) o la combinación de ambas (formas más graves). Para los dos casos se requeriría de una administración múltiple cuya posología se determinaría en los diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* propuestos en modelos de ratón y de perro, estudiando la biodistribución, eficacia, dosis y toxicología de la terapia.

Finalmente, se proponen dos ensayos clínicos, distinguiendo cada uno de ellos por la edad de los pacientes (1 a 6 años; 7 a 15 años), resultando en una novedad con respecto al resto de ensayos clínicos realizados sobre el síndrome de Sanfilippo al incluir a pacientes de edades más avanzadas.

# 1 Introducción

## 1.1 Fisiopatología

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son un grupo muy heterogéneo de en torno a 70 enfermedades monogénicas, que cursan con una alteración en este sistema de almacenaje y reciclado. Esto desemboca en la acumulación de macromoléculas, incapaces de ser degradadas por los lisosomas. Existen 1300 genes y 50 enzimas asociados a la disfuncionalidad lisosomal, clasificándose en función de la macromolécula acumulada (esfingolípidos, glicoproteínas, mucopolisacáridos)(Platt *et al.* 2018).

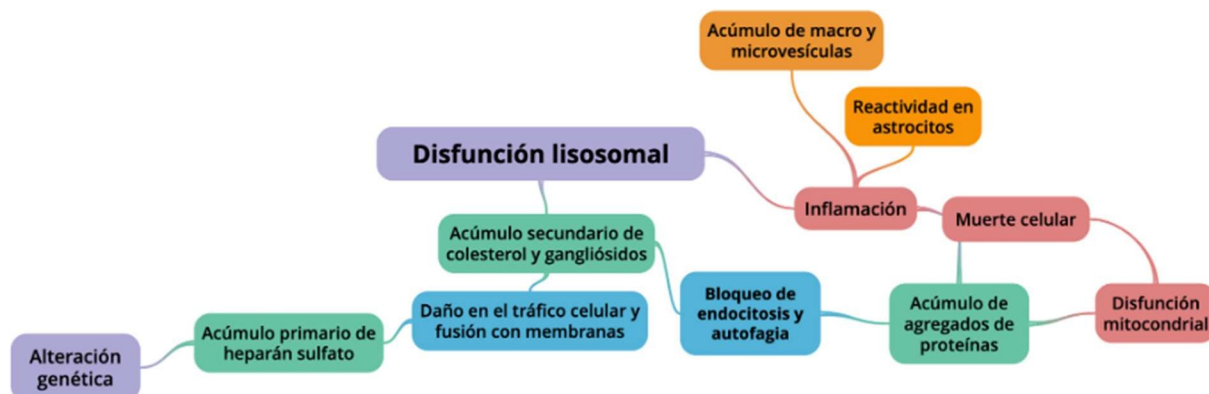
Cuando la acumulación es de mucopolisacáridos, se habla de mucopolisacaridosis (MPS). Dentro de este grupo de enfermedades de herencia esencialmente autosómica recesiva (excepto la tipo II, ligada al cromosoma X), existen varios tipos asociados a deficiencias en hasta once enzimas diferentes implicadas en el catabolismo de glicosaminoglicanos (GAG) (Tabla I). Este proyecto se centrará concretamente en la tipo III o Síndrome de Sanfilippo (Kobayashi, 2018).

**Tabla I.** Resumen de los tipos de mucopolisacaridosis y enzimas implicadas, adaptada de Suárez-Guerrero *et al.*, 2015.

<b>Mucopolisacaridosis</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Enzima implicada</b>	
<b>MPSI</b>	Síndrome de Hurler, Huler-Scheie, Scheie	IDUA	
<b>MPSII</b>	Síndrome de Hunter	IDS	
<b>MPSIII</b>	Síndrome de Sanfilippo	A	SGSH
		B	NAGLU
		C	HGSNAT
		D	GNS
<b>MPS IV</b>	Síndrome de Morquio	A	GALNS
		B	BGAL
<b>MPS VI</b>	Síndrome de Maroteaux-Lamy	ARSB	
<b>MPS VII</b>	Síndrome de Sly	GUSB	
<b>MPS IX</b>	Síndrome de Natowicz, deficiencia en hialuronidasa	HD	

La MPS de tipo III o síndrome de Sanfilippo, es un tipo de MPS en la que se produce un fallo de la degradación del heparán sulfato provocando su acumulación en el lisosoma. Estas moléculas son largas cadenas lineales de azúcares complejos (Li *and* Kushe-Gullberg, 2016), formadas por la unión de  $\alpha$ -glucosamina (sulfatada o acetilada) y ácidos idurónico y glucurónico, por lo que su degradación viene dada por las enzimas glicosidasas, sulfatasas y una N-acetiltransferasa (Guía metabólica, 2014). Se encuentran presentes en todos los tejidos animales, concretamente en membranas plasmáticas y matrices extracelulares (Li *and* Kushe-Gullberg, 2016).

Las distintas alteraciones genéticas bloquean la ruta de degradación del heparán sulfato, llevando a un almacenamiento primario del mismo. Esto induce un daño en el tráfico celular, así como en la fusión con membranas provocando acúmulos de otras moléculas, como son el colesterol o los gangliósidos (almacenaje secundario), tanto dentro del lisosoma como fuera (Benetó *et al.*, 2020). Los distintos depósitos de sustancias provocan la disfuncionalidad completa del lisosoma, así como el bloqueo de la endocitosis y autofagia. La alteración de este último proceso es esencial en la fisiopatología de esta enfermedad, pues es una vía donde macromoléculas u otros orgánulos afuncionales son engullidos por un autofagosoma o doble membrana y fundidos en el lisosoma con el fin de degradarlo. Los siguientes pasos destacan por el inicio de la muerte celular, destacando las neuronales y astrocíticas mediado por el aumento de calcio a nivel citosólico, ya que los gangliósidos conducen a la reducción por parte del retículo endoplasmático de este ión (Benetó *et al.*, 2020), así como una amplia disfunción mitocondrial asociada a la formación de agregados de proteínas. Todo ello acaba desembocando en una gran inflamación y quimiotaxis de macrófagos y neutrófilos, mediada por la presencia de citoquinas, empeorado por la hiperreactividad de los astrocitos. En definitiva, el sistema nervioso central se enfrenta a una profunda neurodegeneración progresiva, lo que explica los síntomas del paciente con síndrome de Sanfilippo. (Sorrentino and Fraldi, 2016)(Fedele, 2015).



**Figura 1.** Esquema rotulado de parte de la fisiopatología del síndrome de Sanfilippo, adaptado de Sorrentino and Fraldi, 2016, Fedele *et al.*, 2015, Benetó *et al.*, 2020 y Li and Kusche-Gullberg, 2016.

Se muestra la relación entre los diferentes mecanismos y cómo cada uno de ellos acaba retroalimentando a los demás.

## 1.2 Clínica

Las personas que padecen el Síndrome de Sanfilippo se caracterizan por poseer rasgos faciales toscos, cejas anchas, pelo seco, enfermedad degenerativa de las articulaciones, hepatoesplenomegalia, macrocrania e hipoacusia. Además, como se ha mencionado

anteriormente, la afectación principal de la MPS tipo III es la degeneración del sistema nervioso central que produce hiperactividad y retraso mental. La edad de aparición de los síntomas y la gravedad pueden variar pero, generalmente comienzan entre el año y los tres años de edad, siendo las etapas prenatales y postnatales tempranas normales. La enfermedad se comienza a manifestar como un retraso en el desarrollo cognitivo, dificultad en el habla y conductas agresivas. La hiperactividad y conducta violenta pueden potenciarse entre los tres y cinco años, además de aparecer alteraciones del sueño. Los síntomas descritos pueden durar entre cinco y diez años, a partir de ahí, los pacientes presentan una disminución progresiva de las funciones motoras y los procesos intelectuales. Por ejemplo, pierden el habla y la capacidad de tragar y caminar por sí mismos. La etapa final de la enfermedad cursa con la presentación de un estado vegetativo que suele desembocar en la muerte. Esto puede ocurrir a edades tempranas durante la adolescencia en los casos más severos, o en casos más leves, a la edad de sesenta años (Fedele, 2015).

### **1.3 Diagnóstico**

Actualmente para el diagnóstico del síndrome de Sanfilippo se utilizan tres métodos principalmente:

- **Análisis GAG**

Consiste en la detección de GAG en la orina de pacientes con sospecha de padecer MPS tipo III. Un resultado elevado de GAG sugiere que existe alguna forma de MPS (Fedele, 2015).

- *Ensayo de actividad*

Se utilizan sustratos radiomarcados y sustratos fluorogénicos. Estos son sustratos artificiales que pueden ser procesados catalíticamente por las enzimas de los fibroblastos de la piel y los leucocitos deficientes en MPS. La base de sustratos radiomarcados es que la actividad enzimática altera la carga del sustrato, lo que permite la separación cromatográfica. En cuanto a los fluorogénicos, se libera un producto de 4-metilumbeliferona fluorescente al completar con éxito la reacción, y puede detectarse empleando un dispositivo fluorométrico (Fedele, 2015).

- *Secuenciación genómica del DNA*

Se lleva a cabo una reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores oligonucleotídicos que abarcan las uniones intrón-exón de los exones del gen de interés (Fedele, 2015).



## 1.4 Tratamientos

### A. *Terapia de Reemplazo Enzimático (ERT)*

Esta estrategia terapéutica consiste en introducir en el paciente una versión funcional de la enzima afectada. La justificación para esta terapia viene dada por la demostración de la incorporación de la enzima funcional por parte de fibroblastos cultivados de pacientes con diferentes MPS (Fratantoni *et al.*, 1969) mediado por el receptor de la manosa-6-fosfato (MPR)(Coutinho *et al.*, 2012)(Desnick *et al.*, 2012), lo cual podría aumentar las posibilidades de éxito en este tipo de enfermedades.

En este enfoque, Barton y su grupo trataron a pacientes con enfermedad de Gaucher con infusiones intravenosas de la versión funcional de la enzima  $\beta$ -glucocerebrosidasa a la que añadieron una terminación de manosa, consiguiendo detener la progresión de la enfermedad y corregir la mayoría de sus síntomas (Barton *et al.*, 1990). Sin embargo, a pesar del éxito que obtuvieron, no se han logrado los mismos resultados en otras MPSs, lo cual pone de manifiesto algunas de las limitaciones de esta terapia, como son el requerimiento de la administración intravenosa semanal de la enzima de por vida, lo cual es un procedimiento costoso (en torno a los 200.000€ anuales), el desarrollo de inmunidad frente a las enzimas recombinantes inyectadas (limitando su eficacia), y la incapacidad de las enzimas recombinantes para atravesar barreras biológicas como la barrera hematoencefálica, no pudiendo tratar las patologías cerebrales que se asocian a las MPSs mediante administración intravenosa (Coutinho *et al.*, 2016).

### B. *Terapia Celular: Trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCs)*

Este tratamiento se basa en la capacidad de las HSCs para diferenciarse en diferentes tipos celulares, incluyendo macrófagos tisulares en bazo y pulmón, células de Kupffer en el hígado y células microgliales en el cerebro. El trasplante de estas células desde donantes sanos proporciona la versión funcional de la enzima deficiente en los pacientes con MPS, reduciendo el GAG acumulado en los tejidos del paciente (Krivit *et al.*, 1995).

Una opción de tratamiento con HSCs se puede dar mediante trasplante de médula ósea o de células aisladas de sangre periférica, lo cual necesita de una gran compatibilidad y ha mostrado una tasa de rechazo del 28-35% y un quimerismo del 45-86% (Souillet *et al.*, 2003). Mientras tanto, pacientes tratados con HSCs obtenidas de cordón umbilical no emparentado mostraron mejores resultados con una tasa de rechazo del 8% y un quimerismo del donante del 97% (Prasad *et al.*, 2008).

Los pacientes injertados con éxito muestran cierta mejoría de los síntomas en pulmones, bazo e hígado; sin embargo, los resultados neurológicos son muy variados, dependiendo en gran medida de la edad y la gravedad de la enfermedad del paciente, siendo, en general, incapaz de mejorar su capacidad neurocognitiva (Wolf *et al.*, 2015). Así, esta terapia se muestra insuficiente para prevenir o revertir los síntomas clínicos a nivel del SNC.

#### C. *Terapia de Reducción de Sustrato (SRT)*

Esta estrategia se basa en la utilización de moléculas pequeñas como inhibidoras de la síntesis del compuesto que se acumula en los lisosomas y, así, equilibrar las tasas de síntesis y la de catabolismo, que se encuentra deteriorada (Radin, 1996). En teoría, este enfoque tenía una serie de ventajas en comparación con la ERT, como son la disponibilidad oral, la no inmunogenicidad, el uso de un solo compuesto para tratar una serie de enfermedades y la posibilidad de poder reducir el almacenamiento en el cerebro (Platt *et al.*, 2003). Sin embargo, para ser un tratamiento eficaz y seguro, esta molécula debe actuar como un inhibidor parcial de la síntesis y debe de ser muy específica para no afectar o bloquear otras rutas metabólicas relacionadas.

En el caso del Síndrome de Sanfilippo, la acumulación de GAG afecta principalmente al cerebro y sistema nervioso, y las ERTs actuales resultan inefectivas para tratar los síntomas neurológicos. Piotrowska *et al.* propusieron una SRT inhibida por genisteína, una isoflavona purificada de la soja, con la que obtuvieron buenos resultados en la reducción del almacenamiento de GAG en células, tejidos y orina de modelos de ratón, además de demostrar que la genisteína era capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. (Piotrowska *et al.*, 2006) (Friso *et al.*, 2010). Sin embargo, esta terapia debe utilizarse en combinación con otras para un efecto clínico significativo.

#### D. *Terapia génica*

Es una estrategia similar a la ERT en la que no se introduce la enzima, sino su secuencia codificante en las células del paciente mediante el uso de un vector viral. De este modo, las células modificadas poseerán la actividad enzimática necesaria además de secretarla para la incorporación de la enzima funcional en las células no modificadas (Hartung *et al.*, 2004).

Esta terapia permite la utilización de técnicas de ingeniería genética para optimizar parámetros como el tropismo y el tamaño del vector, o el nivel y el modo de expresión. A pesar de esta flexibilidad terapéutica y la corrección de la acumulación mostrada en los diferentes órganos en modelos animales, el uso de vectores virales conlleva una respuesta inmune contra estos, limitando su eficacia. En cuanto a los efectos sobre el sistema nervioso,

con la aplicación sistémica intravenosa de esta terapia, en modelos animales para distintas MPSs, con vectores virales adenoasociados-2 (AAVs-2), ha resultado difícil tratar los efectos neurológicos de la enfermedad y han dañado la barrera hematoencefálica (Hartung *et al.*, 2004). Por otra parte, la infusión intravenosa de vectores retrovirales en modelos animales recién nacidos ha mostrado una reducción de la acumulación de GAG en cerebro y una mejoría parcial de los síntomas dependiente de la dosis infundida debido a que la barrera hematoencefálica en neonatos es más permeable (Chung *et al.*, 2007). Sin embargo, no es posible el tratamiento en pacientes neonatos porque la enfermedad no es detectable en edades tan tempranas; además de conllevar cierto riesgo de mutagénesis insercional que puede producirse al utilizar este tipo de vector. Es por esto por lo que se han testado diferentes vías de administración más directas (e invasivas) al SNC (Chung *et al.*, 2007).

#### *D.1. Infusión intracraneal en el parénquima cerebral*

La administración de vectores AAVs-2 y AAVs-5 por inyección directa en el putamen cerebral de modelos de ratón de MPS VII mostraron la eliminación de las lesiones producidas por el almacenamiento lisosómico de forma local en la zona de inyección, siendo la transducción con AAVs-5 la más eficiente (Bosch *et al.*, 2000).

Esta vía de administración ha llegado a ensayo clínico en tres pacientes con MPS IIIA de forma bilateral, resultando en una mejoría neurocognitiva parcial y la necesidad de una mayor investigación de su evolución (Tardieu *et al.*, 2014).

#### *D.2. Infusión intracerebroventricular*

Esta vía se ha explorado como alternativa para alcanzar una mayor transducción cerebral en modelos de ratón de MPS IIIA con vectores AAVs-5 expresando sulfamidasa (SGSH) . Esta investigación mostró un gran número de células transducidas en el bulbo olfatorio, pero un bajo efecto en la corteza, el cuerpo estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo (Fraldi *et al.*, 2007).

Ensayos en modelos de MPS I infundidos con vectores AAVs-8 mostraron mayores niveles de expresión de la enzima funcional, aunque insuficientes para prevenir el deterioro cognitivo (Wolf *et al.*, 2011).

#### *D.3. Infusión intraesternal*

La utilización de esta vía en modelos murinos de MPS IIIB con un vector AAV-2 resultó en un aumento de la longevidad de los ratones, una corrección considerable de la patología lisosomal y una mejoría parcial de las funciones neurológicas, pero no así las motoras aun

utilizando una dosis alta de vector (Fu *et al.*, 2010). A pesar de la eficacia de los modelos preclínicos que utilizan este abordaje, la traslación clínica a través de esta ruta es más problemática, ya que las áreas del cerebro humano involucradas en la función cardíaca y pulmonar serían susceptibles a una posible lesión mecánica (Wolf *et al.*, 2015).

#### *D.4. Infusión intratecal*

Esta vía es menos invasiva que las mencionadas anteriormente, ya que se realiza mediante punción lumbar. Los modelos animales de MPS I y VII infundidos con vectores AAVs-2 por esta vía mostraron una restauración de la actividad enzimática entre el 3 y el 30% (Elliger *et al.*, 1999)(Watson *et al.*, 2006) con una consecuente reducción del almacenamiento lisosómico a nivel de la corteza dependiente de la dosis; siendo necesaria una dosis mayor que en las otras vías.

A pesar de las potenciales ventajas de esta vía, aún no hay suficientes estudios sobre sus efectos sobre la prevención y reversión de la neuropatología (Wolf *et al.*, 2015).

#### *E. Terapia celular mixta: transducción de HSCs ex vivo*

El principal efecto no deseado del tratamiento con terapia génica es el desarrollo de respuesta inmune frente a los vectores virales, lo que impide un tratamiento repetitivo. Para evitar este problema, se planteó la transducción *ex vivo* de HSCs autólogas, lo cual soluciona el problema de compatibilidad del trasplante alogénico. Los ensayos de Wolfe *et al.* mostraron que la infusión intravenosa de HSCs transducidas con un vector lentiviral fue capaz de reducir el almacenamiento en bazo e hígado de modelos de ratón de MPS VII sin resultados neurológicos significativos (Wolfe *et al.*, 1992). En otro enfoque, se infundieron las células transducidas vía intracerebroventricular en modelos de ratón de MPS IIIA (Langford-Smith *et al.*, 2012), mostrando una reducción de la acumulación y una mejoría neurocognitiva parcial pero transitoria debido al desarrollo de una respuesta inmune frente a las células modificadas por parte de los animales. Por lo tanto, esta terapia necesita de una mayor investigación y desarrollo.

La Tabla II ofrece la representación resumida de los tratamientos analizados en este apartado.

**Tabla II.** Resumen de las ventajas y desventajas de las distintas terapias actuales.

Terapia			Ventajas	Inconvenientes		
ERT (Coutinho et al., 2016)			Detiene propagación de la enfermedad	Administración intravenosa semanal de porvida		
			Corrección parcial de síntomas	Caro		
Trasplante alogénico de HSCs (Wolf et al., 2015)			Mejoría parcial hígado, pulmón y bazo	Desarrollo de inmunogenicidad		
				Efecto limitado en hueso, pulmón, cerebro y riñon		
SRT (Coutinho et al., 2016)			Disponibilidad oral	Posibilidad de afectar a varias rutas metabólicas importantes		
			No inmunogenicidad			
			1 compuesto puede tratar varas enfermedades	Tiene que ser un inhibidor específico		
			Posible reducción de la acumulación en cerebro			
Terapia Génica (Wolf et al., 2015)			Reducción parcial de acumulación de GAG			
			Administración	Vía		
			Sistémica	Intravenosa	Logra expresión en el cerebro	Inmunogenicidad
					Corrección parcial de síntomas	Posible daño barrera hematoencefálica
			Sistema Nervioso Central	Parénquima cerebral	Mejora neurológica parcial localizada	Inmunogenicidad
					Estabilización de los pacientes	Pocos ensayos clínicos
				Intracerebro-ventricular	Mejora neurológica parcial generalizada	Bajo nivel de transducción
					Alto nivel de expresión	Prevención insuficiente del déficit cognitivo
			Intraesternal		Aumento longevidad	Invasiva
					Corrección considerable de la acumulación	Inmunogenicidad
					Mejora parcial funciones neurológicas	Necesita alta dosis de vector
						No mejora motora
			Intracatecal		Menos invasiva	Problema de traslado a la clínica
					Restauración enzimática y neurológica parcial	Necesita alta dosis de vector
Terapia celular mixta con HSCs autólogas (Wolf et al., 2015)			Compatibilidad	Resultados neurológicos indudicentes		
				Mejoría parcial hígado, pulmón y bazo	Inmunogenicidad en animales	
			Sistémica		Intravenosa	No mejoría neurológica
				Tiempo de producción		
			Sistema Nervioso Central	Intracerebro-ventricular	Compatibilidad	Inmunogenicidad en animales
					Mejoría parcial y transitoria de la neuropatología	Falta investigación
			Tiempo de producción			

## 1.5 Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células multipotentes que se pueden diferenciar en distintos tipos celulares, manteniendo su alta capacidad de autorrenovación. Se encuentran en múltiples localizaciones como la médula ósea y el tejido adiposo principalmente. Para identificarlas y definir las, es esencial que cumplan estos tres criterios mínimos establecidos por la Federación Internacional para la Terapia y la Ciencia (IFATS) y la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) (Bourin *et al.*, 2013)(Dominici *et al.*, 2006):

1- Adherencia plástica.

2- Expresión de CD73, CD90 y CD105, y ausencia de expresión de CD11b, CD14, CD19, CD45 y HLA-DR.

3- Potencial de diferenciación en preadipocitos, condrocitos y osteoblastos.

Estas células tienen un tropismo fisiológico hacia tejidos dañados, especialmente, en los que destaca la inflamación; tal y como se ha visto en fracturas de cadera, hipoxia cerebral o glioblastoma, por citar algunos ejemplos (Eggenhofer *et al.*, 2014). Concretamente, en el último caso se detectó mediante autopsia cómo las células madre neurales se habían organizado formando satélites en torno al tumor (Al-kharboos *et al.*, 2020). En otro estudio, se observó cómo, mediante una infusión intravenosa en ratas de células mesenquimales, éstas migraron a la zona isquémica del cerebro e incrementaron la formación de progenitores neurales, así como oligodendrocitos, neurofilamentos y sinapsis (Dabrowska *et al.*, 2019).

Aunque el mecanismo de este tropismo no está completamente definido, se sabe que viene dado por señales quimiotácticas como la sobreexpresión del receptor CXCR4, el aumento de vasopermeabilidad y la producción de diferentes citoquinas proinflamatorias (Eggenhofer *et al.*, 2014).

### 1.5.1 Capacidad inmunomoduladora

Una de las características terapéuticas esenciales de este tipo celular es su conocida capacidad inmunomoduladora tanto en la inmunidad innata como adquirida. En la primera nombrada, puede identificarse (Zachar *et al.*, 2016)(Regmi *et al.*, 2019):

- Quimiotaxis de neutrófilos mejorada y disminución de su apoptosis. Inhibición de las funciones citotóxicas de las células *natural killer* (NK).

- Diferenciación de macrófagos hacia un fenotipo de tipo M2 o antiinflamatorio (liberación de IL-10) y reducción de sobreexpresión mediante mecanismos *down-regulation*.
- Supresión de la diferenciación de monocitos CD14+ a células dendríticas y bloqueo de la proliferación y maduración de estas células presentadoras.
- Influencia en el reclutamiento de leucocitos.
- Capacidad de coordinar el cambio de inmunidad innata a adaptativa.

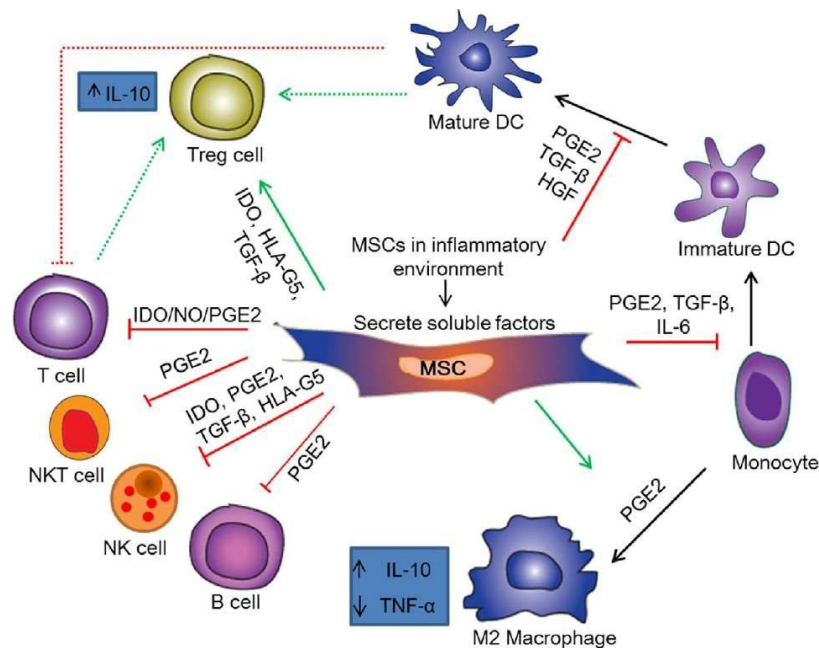
Por otro lado, en la inmunidad adaptativa tienen un papel fundamental y está más estudiado pues es la base del interés en esta modulación: las MSCs son capaces de promover la supervivencia de linfocitos T pero a su vez, mantenerlos en reposo evitando su proliferación y sobreactivación (bloqueando la liberación de citoquinas proinflamatorias). Además, favorece la expansión de células T reguladoras en sangre periférica y coordina la diferenciación de células B plasmáticas hacia una línea de células B de tipo regulador. Además, mantiene las células B en estado de reposo, suprimiendo su capacidad de producción de anticuerpos (Bernardo *and* Fibbe, 2013).

Sin embargo, no es su única actividad, también son capaces de (Owens *and* Lankins, 2018):

- Regular la permeabilidad de los vasos mediante el contacto con células endoteliales.
  - Regular indirectamente, vía comunicación con el endotelio, el reclutamiento de leucocitos durante la inflamación.
  - Interaccionar con células madre estromales residentes para favorecer la reparación tisular.

Además, incluso cuando estas células son fagocitadas por macrófagos, la capacidad inmunosupresora es adquirida por dichos macrófagos, permitiendo mantener la capacidad durante toda la vida del macrófago (Owens *and* Lankins, 2018).

En definitiva, el uso de células madre en pacientes de Sanfilippo puede ser útil en este aspecto, ya que parte de su SNC se encuentra o encontrará, según evolucione la enfermedad, inflamado y apoptótico, dos situaciones íntimamente relacionadas y retroalimentativas. Una disminución de la inflamación, por sí mismo, podría reducir o frenar la evolución de la muerte neuronal pues se ha comprobado que el uso de estas células es muy eficaz para orientar el sistema inmune hacia una postura anti-inflamatoria y control de la respuesta inmunitaria (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de liberación de citoquinas por parte de las MSCs, adaptada de Regmi et al., 2019. Las MSCs liberan una alta cantidad de citoquinas antiinflamatorias que interfieren en la polarización de numerosas células hacia un estado de disminución de la inflamación, como se ve en la figura.

### 1.5.2 Efecto sobre el SNC

Las MSCs tienen la capacidad de ejercer funciones paracrinas según lo requiera el entorno en el que se encuentran. En el caso del sistema nervioso, se han caracterizado por poseer un efecto neurotrófico y neuroprotector que promueve la regeneración neuronal. Entre los factores que secretan con este fin se encuentran BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía), CNTF (factor neurotrófico ciliar humano) y la neurotrofina 4 (Wei *et al.*, 2009). Además, son capaces de secretar factores antiapoptóticos y angiogénicos como HGF (factor de crecimiento hepático), TGF-β (factor de crecimiento transformante β) y VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) (Miranville *et al.*, 2004.). De este modo, pueden generar un microambiente idóneo para la supervivencia, proliferación y regeneración del tejido neuronal (Blesch, 2006). Mediante factores como GDNF también promueven la activación y proliferación de la microglía, habiéndose demostrado poder normalizar y frenar el avance de enfermedades neurodegenerativas (Jha, 2018). Otro de los factores neurotróficos más importantes para el desarrollo del sistema



nervioso es BDNF, el cual tiene un efecto positivo sobre la plasticidad sináptica, la comunicación entre neuronas y glía, fundamental para el correcto mantenimiento neurológico, y la regulación del crecimiento de neuritas . Además, la glía es capaz de promover la expresión de BDNF al recibir estas señales (Fields and Burnstock, 2006).

### 1.5.3 Biodistribución

En el estudio de biodistribución y tropismo de las MSCs, se observa primero una acumulación en pulmón, y posteriormente, recircularizan (especialmente entre los días 1 - 7) hacia el resto de los tejidos, destacando los tejidos dañados, por ejemplo, en fístulas anales de modelos ratones con colitis ulcerosa (Lopez-Santalla, 2017), en tejidos irradiados y en isquemia cerebral (Sensebé *and* Fleury-Cappellosso, 2013). Sin embargo, puede observarse fluorescencia con estudios de proteína roja fluorescente (RFP) en el resto de órganos, especialmente y en este orden: hígado, bazo y riñón (Sánchez-Díaz *et al.*, 2021). Tras estas dos primeras fases, se da una amplia distribución hacia el resto de tejidos: intestino, timo o piel. Esta redistribución podría explicarse con la fagocitosis por parte de macrófagos de las células mesenquimales, su polarización y posterior activación de las células T reguladoras, es decir, las primeras fases de inmunomodulación descritas en puntos anteriores (Sánchez-Díaz *et al.*, 2021). Aunque se identifican estudios muy variables, se han podido observar secuencias de DNA humano en hígado hasta 31 semanas tras la infusión intravenosa y hasta tres meses en otros órganos como bazo (Sensebé *and* Fleury-Cappellosso, 2013). Otros factores que puede influir en la biodistribución son el lugar de administración (demostrando que la vena mesentérica superior es más selectiva hacia hígado y permite una estancia más larga de las células), así como la edad de los ratones receptores (recomendando una edad inferior a 28 días, pues se observa una biodistribución más amplia, especialmente en corteza cerebral y bazo). Sin embargo, es necesario destacar que se cree que apenas un 1% de las MSCs llegan a tejidos periféricos (excluyendo pulmones, hígado o bazo)(Sánchez-Díaz *et al.*, 2021), mientras que la administración local puede alcanzar un 10 - 20%, manteniéndose durante más tiempo (Sensebé *and* Fleury-Cappellosso, 2013). Es por ello por lo que en este proyecto se propone el uso de una técnica de administración intranasal debido a su administración más localizada (en puntos siguientes se explicará más en detalle el mecanismo de esta vía) y menos invasiva.

Los estudios de biodistribución también permiten identificar el tiempo que se mantendrán las MSCs en los tejidos de interés, aspecto importante para los posteriores ensayos de dosis donde se fijará el tiempo entre cada una de ellas (dosis múltiple). La dosis múltiple en células mesenquimales ya se puede observar en estudios como el de Cotten *et al.*, en pacientes neonatales con alteraciones como displasia broncopulmonar o encefalopatía isquémica,

donde en alguno de ellos administraron una primera dosis a las 24 - 72 horas, seguida de hasta tres dosis más en las 48 – 72 horas siguientes. En ninguno de los neonatos se notificaron reacciones adversas asociadas a la administración múltiple de mesenquimales (Cotten *et al.*, 2014).

#### **1.5.4 Corrección cruzada**

Las enzimas lisosomales se traducen en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y posteriormente se trasladan al lumen del mismo. En el interior del RER y del aparato de Golgi sufren modificaciones postraduccionales como la adición de oligosacáridos, manosa y/o manosa-6-fosfato, a residuos de asparagina. A continuación, las proteínas se clasifican en el aparato de Golgi por la unión a MPR. Estos complejos se fusionan en vesículas que se dirigen a lisosomas con pH ácido que permite la disgregación de los complejos ligando-receptor para que las enzimas lisosomales se dirijan a la diana (Wolf *et al.*, 2015).

Sin embargo, entre un 5-20% de estas proteínas se secretan al exterior celular sin circular por el lisosoma. De este modo, las enzimas pueden interactuar con los MPRs presentes en la superficie de las células circundantes e internalizarse en las mismas (Wolf *et al.*, 2015).

Este mecanismo es la base de muchas terapias empleadas en enfermedades de almacenamiento lisosomal, en el que la falta de alguna enzima de este sistema causa la acumulación de macromoléculas. Si estas células toman la enzima ausente desde el espacio extracelular, se logra corregir el fenotipo al degradar los GAGs acumulados. Este fenómeno se denomina "corrección cruzada" y permite el uso de la ERT, cuya efectividad se basa en la secreción de la enzima por dichas células madre y su internalización en las células vecinas (Sergijenko *et al.*, 2013). De esta manera, la sobreexpresión de la enzima dará lugar a una mayor secreción y posterior internalización, traduciéndose en una mayor corrección cruzada.

#### **1.5.5 MSCs y vectores AAVs**

Las MSCs se emplean en medicina regenerativa debido a su alta capacidad de autorrenovación y su fácil y rápida obtención. Además, son muy eficientes en la secreción de moléculas bioactivas. Todo ello las convierte en una buena opción para el tratamiento de muchas enfermedades, viéndose reflejado en el aumento de su manejo para diferentes tipos de terapias (Ozawa *et al.*, 2008).

En muchos casos estas células se emplean de manera directa, sin una previa modificación genética, ya que el efecto buscado no es otro que su capacidad inmunomoduladora. Sin embargo, en otros casos se busca un efecto más concreto y se requiere de dicha

modificación. En la ingeniería genética los vectores virales son ampliamente utilizados debido a la alta eficacia de transducción.

Los AAVs son virus deficientes en replicación por naturaleza, cuyo genoma está constituido por DNA de cadena simple. Esta característica los dota de una ventaja en seguridad con respecto a otros virus para su uso en clínica. Además, al ser recombinantes se eliminan genes relacionados con el ciclo viral impidiendo el proceso de integración en el genoma, por lo que permanecerá de forma episomal tras infectar las células. Esta propiedad aporta una mayor seguridad con respecto al uso de vectores lentivirales, ampliamente utilizados en la literatura, pero compartiendo la capacidad de infectar tanto a células quiescentes como en división. Por tanto, se reduce el riesgo de mutagénesis insercional, un gran aspecto negativo a tener en cuenta en este tipo de terapias. Por otro lado, presentan menor inmunogenicidad en comparación con vectores adenovirales (Stender *et al.*, 2007).

Consecuentemente, el uso de estos vectores se ha ido expandiendo, y de sus diversos estudios se han obtenido vectores con cápsides modificadas que mejoran notablemente la capacidad de transducción a diversos tejidos y la expresión del gen exógeno en los mismos (Zubkova *et al.*, 2021).

Las ventajas del uso de vectores AAVs expuestas han manifestado el gran potencial de los mismos para fines terapéuticos, extendiendo su uso en clínica como estrategia de modificación genética de MSCs. En estos estudios se ha demostrado la estabilidad del transgén, así como la alta eficiencia de transducción (Wang *et al.*, 2013).

## **1.6 Propuesta**

Analizadas las ventajas y limitaciones de cada terapia, se propone una terapia avanzada con MSCs modificadas genéticamente mediante vectores AAVs, que sobreexpresen la enzima SGSH, deficiente en pacientes con Síndrome de Sanfilippo. El estudio se centra en la MPS IIIA, ya que es la más prevalente y más grave, aunque existen tres tipos más. Las células madre no solo aportarán la enzima, sino que su propia presencia inmunomodulará y establecerá contacto con neuronas y astrocitos, suponiendo un soporte al nicho neuronal. El objetivo seguido es la administración periódica del tratamiento vía intranasal, combinada cuando sea necesario, con la intravenosa para obtener una degradación progresiva del heparán sulfato acumulado, disminución de la inflamación (y con ello de la apoptosis) y soporte y apoyo por parte de las células madre implantadas.

## **2 Diseño experimental**

### **2.1 Obtención y caracterización de las MSCs**

Como se ha mencionado anteriormente, las células que se propone usar en este proyecto son MSCs. Existen diferentes fuentes de donde se pueden obtener. La primera de ellas en descubrirse fue la médula ósea; sin embargo, se obtiene una cantidad reducida de células y depende mucho del estado del paciente en cuanto a su edad, comorbilidades, entre otras cosas. Por ello, se comenzaron a utilizar otros tejidos en los que se detectó la presencia de estas células. Se utilizarán MSCs de tejido adiposo, ya que el proceso de obtención es mucho menos agresivo y se adquiere una mayor cantidad de MSCs (García-Muñoz & Vives, 2021).

El protocolo de aislamiento de MSCs de tejido adiposo constará de diferentes etapas. En primer lugar, se extraerá la grasa procedente normalmente del abdomen o del glúteo, mediante liposucción o lipectomía. A continuación, se llevará a cabo una digestión mecánica mediante la cual el tejido es dividido en pequeños fragmentos para, posteriormente, proceder a la digestión enzimática. Este paso requerirá una serie de lavados previos mediante los cuales se eliminarán otro tipo de células, restos celulares y aceites. Después, el tejido se incubará con colagenasa a 37°C bajo agitación suave permanente o intermitente durante 2 a 4 horas. Posteriormente, se filtrará para eliminar restos de grasa sin digerir del todo. Después, la suspensión se centrifugará para obtener en el pellet la fracción de las células estromales, que contendrá una mezcla heterogénea de distintas células, incluyendo progenitores mesenquimales. Finalmente, las MSCs obtenidas, se resuspenderán en medio específico y se cultivarán en una placa estéril (García-Muñoz & Vives, 2021).

En el presente trabajo, las MSCs para el tratamiento del síndrome de Sanfilippo serán alogénicas. El principal motivo por el cual no se pretende usar células autólogas, es que los pacientes con esta enfermedad son en su mayoría bebés y niños en la primera infancia y, en consecuencia, no es posible extraer una cantidad adecuada de grasa para aislar suficientes células (García-Muñoz & Vives, 2021).

#### **2.1.1 Características de las MSCs**

Como se comentaba anteriormente, por definición, para que las células aisladas sean asumidas como MSCs, ha de tener capacidad de diferenciarse en tres linajes celulares: adipocitos, condrocitos, y osteocitos, y mantenerla cuando sea crecida *in vitro* e *in vivo*.

### Diferenciación osteogénica

Se cultivará a confluencia una monocapa de MSCs en combinación con dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP) y ácido ascórbico, además de vitamina D3, TGF $\beta$  y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). La dexametasona es un glucocorticoide sintético que induce la expresión de factores transcripcionales como la integrina  $\alpha 5$  o TAZ, todos ellos promotores de la diferenciación de este linaje. Habrá de administrarse en una concentración de 10 nM durante tres semanas (condiciones fisiológicas) pues concentraciones mayores inhiben el proceso de osteogénesis e inducen una osteoporosis corticoide-dependiente. El  $\beta$ -GP es imprescindible pues es enzimáticamente hidrolizado por una fosfatasa y supone una fuente crucial de fosfato inorgánico. El ácido ascórbico actuará como factor de la hidroxilación de prolina y lisina en el colágeno, componente principal de las matrices extracelulares. Se podrá emplear vitamina C de larga actuación derivada de ácido ascórbico 2 fosfato para superar la inestabilidad que presenta el ácido ascórbico a condiciones fisiológicas. Las concentraciones que serán empleadas para inducir el proceso de osteogénesis están en torno a 50 - 500 nM. Y por último, la vitamina D3 será imprescindible para la función de los osteoblastos; el TGF $\beta$ 1 juega un papel fundamental en la modulación de la formación y degradación de una gran variedad de componentes de la matriz ósea; y las BMPs promueven la diferenciación del osteoblasto (Corina *et al.*, 2011).

Una vez crecido, se analizará la presencia de células que pasan de una estructura fibroblastoide a una cuboidal con producción de matriz extracelular y presencia de colágeno tipo I (positivo para las reacciones de *alizarin-red* y *von Kossa*), calcio y fosfatasa alcalina (ensayos de colorimetría). Finalmente, se identificarán, a través de análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR, las proteínas específicas de tejido óseo, concretamente, se deciden identificar osterix (*osx*) y colágeno tipo 1 alfa 1 (*Col1a1*), debido a que su presencia es muy precoz dentro del proceso de diferenciación (Corina *et al.*, 2011).

### Diferenciación condrogénica

En este caso, la formulación no difiere tanto de la anterior; sin embargo, se han de destacar unas especificidades. Para la diferenciación condrogénica es esencial el contacto célula-célula trabajando a partir de cultivos de alta densidad o *pellets*. Así como la presencia de 100 nM de dexametasona (que regula a la alza la expresión de genes codificantes para proteínas de la matriz), TFG $\beta$  (100 ng/ml) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Este último ha demostrado favorecer la supervivencia tanto de las MSCs como de los condrocitos una vez diferenciados, e inducir la expresión de marcadores condrocíticos, incluyendo colágeno tipo II (proteína más importante de la matriz extracelular del tejido cartilaginoso) y proteoglicanos. De hecho, se define esta formulación como la más efectiva para esta

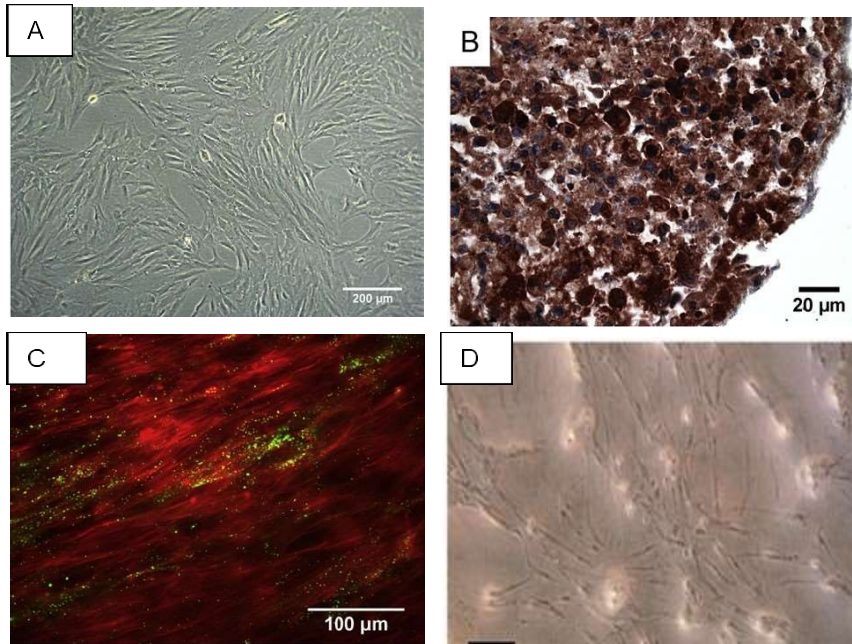
diferenciación. Además, se ha de incluir ácido ascórbico, también implicado en la generación de colágeno tipo II y BMPs. El medio debe ser libre de suero para evitar la posible apoptosis inducida por él, por lo que se sustituye por plasma rico en plaquetas, que además de verse enriquecido en plaquetas, cuenta con factores de crecimiento como el comentado TGF $\beta$ 1 y VEGF (Corina *et al.*, 2011).

A lo largo del ensayo se irá observando la evolución de las células fibroblastoides hacia unas células más redondeadas y grandes, rodeadas de una ancha matriz extracelular conformada, esencialmente, por colágeno tipo II y agregados de proteoglicanos y GAGs de alto peso molecular (positivo para el reactivo Azul de Toluidina). Se analizará mediante RT-PCR cuantitativa la expresión de factores de transcripción codificados por el gen SRY (factor determinante testicular), relacionado con el grupo de alta movilidad 9 (Sox9), así como las proteínas: colágeno de tipo II (Col2), IX (Col9), X (Col10) y XI (Col11) (Corina *et al.*, 2011).

#### Diferenciación adipogénica

Para este tercer y último ensayo de diferenciación se cultivarán las MSCs hasta la confluencia e incubarán con diferentes compuestos. Entre ellos, se repite la dexametasona, pues produce la acumulación de factores de transcripción como C/EBP y PPAR $\gamma$ , cruciales para la conversión. A continuación, se ha de añadir el 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) que también promueve la expresión de PPAR $\gamma$  y de *lipoproteínlipasa*, mientras bloquea la expresión de marcadores de osteogénesis. La insulina, se ha descubierto como el fármaco más potente para estimular la adipogénesis, acumulando triglicéridos. De los antiinflamatorios no esteroideos, la indometacina, inhibidor de la ciclooxigenasa, bloquea la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos. Y para acabar, el factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF- $\beta$ 2) actúa como proadipogénico. Se recomienda el uso de suero humano (Corina *et al.*, 2011).

El proceso de diferenciación a adipocitos es secuencial, resumidamente, se podrá observar como la MSC empieza a adquirir una forma más redondeada con alta expresión de proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, laminina o colágenos, detectables mediante inmunofluorescencia; y posteriormente, se apreciará la presencia de vacuolas ricas en lípidos de manera intracelular que se identifican mediante tinción con aceite rojo O y determinando la actividad de la enzima glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (GPDH). Se analizará la expresión de las proteínas específicas de adipocitos mediante RT-qPCR, para el estudio de los genes codificantes de las proteínas PPAR $\gamma$ 2, C/EBP, LPL y cadena alfa 2 de tipo 6 de colágeno (a2cOL6), que son marcadores frecuentes y precoces (Corina *et al.*, 2011) (Figura 3).



**Figura 3.** *Diferenciación de MSCs (A) a células de distintos tejidos.* Tras la observación al microscopio, ha de confirmarse la correcta diferenciación de las células. Para ello, se utilizan diferentes reactivos: tejido adipogénico (B: tinción con aceite rojo O), condrogénico (C: inmunohistoquímica) y osteogénico (D: tinción *von Kossa*).

## 2.2 Vector AAV

El método elegido para transfectar las MSCs y producir la sobreexpresión del gen terapéutico es biológico, es decir, se realizará mediante vectores virales. Por tanto, se trata de un proceso de transducción a través de vectores AAVs. Se ha elegido este método por su mayor seguridad con respecto a otros vectores virales, como ya se ha expuesto anteriormente.

### 2.2.1 Diseño del constructo

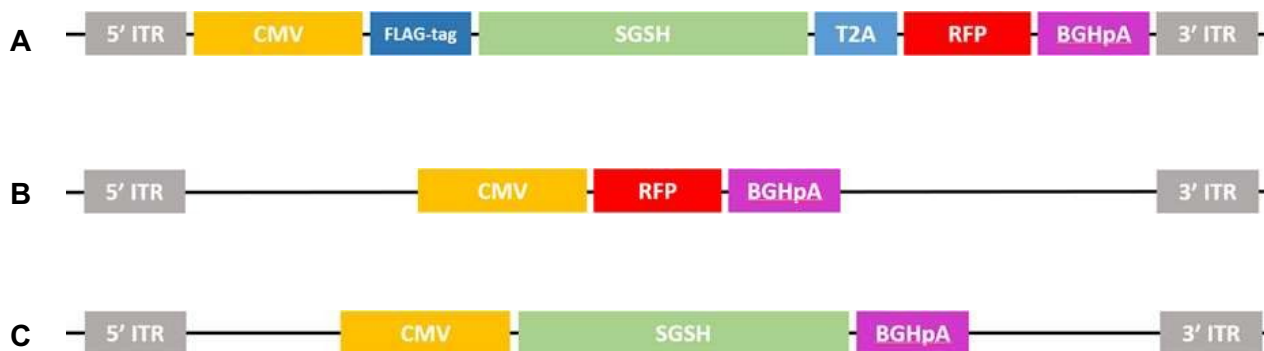
En la producción de los AAVs son necesarios varios plásmidos, concretamente se emplearán tres, por lo que se trabajará con un vector viral de segunda generación. Todos los plásmidos contendrán un origen de replicación que permite el mantenimiento de los mismos durante la división celular, así como un marcador de resistencia a Ampicilina para realizar la selección en bacterias durante el proceso de amplificación en las mismas.

- Plásmido *Helper* (Addgene, 2022). Contiene la mayoría de los genes requeridos para la producción de partículas víricas: E2A, E4 y VA RNA. Estas proteínas provienen de la especie adenoviral, ya que los AAVs son deficientes en replicación por naturaleza y requieren de estas proteínas para completar su ciclo viral (Anexo 1A).

- Plásmido AAV-DJ (Cell Biolabs, 2022). Aporta el gen *Rep* procedente del serotipo AAV-2 necesario para la replicación y empaquetamiento, así como el gen *Cap* quimérico codificante de las proteínas que conformarán la cápside. El gen *Cap* es quimérico, mezcla de 8 serotipos (AAV-2, AAV-4, AAV-5, AAV-8, AAV-9, AAV aviar, AAV bovino y AAV caprino). Se obtiene a través de un proceso de *DNA Family Shuffling* que facilita la obtención de una compleja librería de proteínas. Esta cápside quimérica le dota al vector viral de una mayor tasa de infectividad en una amplia serie de tejidos (Anexo 1B).
- Plásmido de clonaje (*System Biosciences*, 2022). Es el plásmido de expresión que contendrá el constructo de interés flanqueado por las *Inverted Terminal Repeats* (ITR). Estas secuencias son reconocidas por las proteínas de la cápside, por lo que será el único material genético dentro de las partículas virales recombinantes una vez se hayan producido. Se emplearán tres plásmidos de clonaje para producir tres tipos de vectores AAVs:
  - Vector experimental. Presenta el cDNA del gen de la SGSH, junto con la etiqueta *FLAG-tag* en el extremo N-terminal de SGSH, la secuencia T2A para el péptido 2A y generar un posterior corte proteolítico, y el cDNA de la proteína fluorescente roja RFP. Todo ello en fase de lectura y bajo el control del promotor de sobreexpresión del citomegalovirus (CMV) y con la cola poliA procedente de la hormona de crecimiento bovina, BGHPA. Este constructo presenta alrededor de 4,5 kb, ideal para el ensamblaje del AAV (Figura 4A).
  - Vector control negativo. En este caso se excluye el gen SGSH y la etiqueta, manteniendo RFP. En total presenta un tamaño de alrededor de 1,8 kb, por lo que habrá que introducir intrones no codificantes hasta llegar al tamaño ideal de 4,5 kb (Figura 4B).
  - Vector clínico. Incluye el gen terapéutico, sin el *tag* ni el marcador fluorescente. Todo ello tiene un tamaño de 4 kb, requiriendo de nuevo la adición de intrones hasta llegar al tamaño idóneo (Figura 4C).

Los plásmidos *Helper* y AAV-DJ se obtienen directamente de kits comerciales. Sin embargo, el plásmido de clonaje requiere de un procesamiento previo a su utilización. Este procesamiento consiste en intercambiar el promotor EF1 $\alpha$  por CMV, así como eliminar el enhancer WPRE del plásmido de clonaje obtenido de *System Biosciences*. Por otro lado, también se debe introducir el cDNA de la SGSH humana, cuya secuencia está descrita en el Anexo 2, introducir intrones, incluir la etiqueta *FLAG-tag* y eliminar T2A y RFP dependiendo de cuál de los tres vectores se vaya a producir.





**Figura 4.** Esquema de los diferentes constructos empleados para la producción de los diferentes vectores AAVs. El vector experimental estará conformado por el promotor CMV, la etiqueta FLAG-tag, el cDNA de SGSH, T2A, RFP, la cola poliA y las regiones ITR 5' y 3' (A). El vector control negativo estará conformado por el promotor CMV, RFP, la cola poliA y las regiones ITR 5' y 3' (B). El vector clínico estará constituido por el promotor CMV, el cDNA de SGSH, la cola poliA y las regiones ITR 5' y 3' (C).

Por último, cabe destacar que el gen E1 necesario para completar el ciclo viral y la producción de los virus recombinantes será aportado por la célula empaquetadora, donde se producirá el ensamblaje de los vectores (Cell Biolabs, 2022).

## 2.2.2 Producción del vector viral

La producción de estos vectores requiere de una célula de apoyo en la que se co-transfecten todos los plásmidos necesarios anteriormente mencionados, esta es la célula empaquetadora. La línea celular establecida para este procedimiento es la HEK-293 procedente de riñón humano debido a su facilidad de transfección.

Se realizará una mezcla en un ratio molar de 1:1:1 para los plásmidos AVV-DJ, el plásmido *Helper* y el plásmido de expresión correspondiente. Sobre esta mezcla se añadirá una solución de 1mg/mL de polietilenimina (PEI) hasta obtener un ratio de 1:3 µg ADN/µg PEI. Después de mezclar vigorosamente, se añadirá a una placa con células HEK-293 al 80-90% de confluencia. El cultivo deberá incubarse durante 96 horas para recoger posteriormente las células y procesarlas (Addgene, 2022).

Los AAVs son virus sin envuelta, por lo que en el proceso de obtención de los mismos se deberá lisar la célula empaquetadora pues los virus recombinantes se encontrarán en su interior. El método elegido por excelencia es la sonicación. Además, se empleará una endonucleasa, como la benzonasa, para eliminar el ácido nucleico procedente de los restos

celulares o de los plásmidos utilizados. Posteriormente, se procederá a la centrifugación de la suspensión viral para clarificar la muestra (Addgene, 2022).

#### **a. Purificación y concentración**

La purificación de los vectores AAV se realizará a través de ultracentrifugación en gradiente de iodixanol, separando las partículas en diferentes zonas según su coeficiente de sedimentación. Este proceso posibilita la eliminación de impurezas en la muestra, así como la separación de cápsidas vacías de aquellas que porten en su interior el constructo de interés (Addgene, 2022).

Se prepararán cuatro soluciones de iodixanol con rojo fenol en fases alternas con el objetivo de distinguir los diferentes gradientes:

- Iodixanol al 15%. Contiene además NaCl a 1M para desestabilizar las interacciones iónicas entre macromoléculas.
- Iodixanol al 25%. Tiene el objetivo de eliminar contaminantes de densidades reducidas, como cápsidas vacías.
- Iodixanol al 40%. Presenta la misma finalidad que la solución anterior y es donde se encontrarán los vectores AAV de interés.
- Iodixanol al 60%. Sirve como colchón de los viriones que portan el constructo.

Tras añadir en un mismo tubo los cuatro gradientes con cuidado de no mezclarlos entre sí, se añadirá la suspensión viral clarificada y se centrifugará para facilitar la separación de los componentes. La fracción de iodixanol al 40% se deberá aislar pues contendrá los vectores virales (Addgene, 2022).

#### **b. Titulación viral**

No existe un procedimiento establecido para la titulación de partículas víricas. Es por ello que se eligen dos métodos distintos, en este caso *digital droplet* PCR y qPCR. Para la ddPCR se emplearán cebadores específicos dirigidos a los elementos IRT de los AAVs. Tras los ciclos de PCR, se obtendrá el resultado a través del *Droplet Reader*. En la qPCR también se emplearán cebadores que reconozcan los ITR, pero con la tecnología de SYBR *Green* que posibilita la cuantificación de los resultados. En ambos casos se deberá incluir un control sin muestra (Addgene, 2022).

Finalmente, serán tres los vectores AAVs obtenidos de los tres plásmidos de expresión empleados y anteriormente descritos. Es por ello que el proceso de producción, purificación y titulación debe realizarse de forma independiente para cada uno de ellos.

### 2.2.3 Transducción de MSCs con vectores AAV

Las MSCs de donantes de grasa se cultivarán a una confluencia del 80%. Posteriormente, se infectarán con los diferentes vectores AAVs producidos a un MOI de 100000 partículas virales/célula (Zubkova *et al.*, 2021). De este modo, serán tres los tipos de MSCs obtenidas:

- MSCs (FLAG-SGSH-T2A-RFP). Estas células se obtienen de su transducción con el vector experimental sobreexpresan la sulfamidasa junto con el *tag* y la proteína fluorescente roja. Se emplearán en los estudios *in vitro* e *in vivo*.
- MSCs (RFP). Actuarán a modo de control negativo, empleándose en los estudios *in vivo*, pues se sigue pudiendo hacer un seguimiento de las mismas a través de RFP, sin sobreexpresar la sulfamidasa. Estas células se obtienen a través de su transducción mediante el vector control negativo.
- MSCs (SGSH). Estas células son las que finalmente serán aplicadas en clínica ya que sobreexpresan el gen terapéutico sin los marcadores, siendo producidas por la transducción de las MSCs por el vector clínico.

## 3 Ensayos in vitro

### 3.1 Estudios de expresión de proteína

Antes de pasar a los estudios *in vivo*, es imprescindible identificar si la enzima se está expresando y en cantidades suficientes como para tener el efecto terapéutico objetivo.

Se parte de unas MSCs previamente transducidas con el vector AAV, traducándose en la sobreexpresión de la SGSH marcada con la etiqueta *FLAG-tag*. Es importante la presencia de este *tag* porque la MSC ya tiene enzima SGSH endógena, de poco interés debido a su baja expresión, y se requiere la identificación de la enzima sobreexpresada. Como se comentaba anteriormente, será necesaria la presencia de una cantidad lo suficientemente significativa como para que sea capaz de hacer frente al acúmulo de heparán sulfato en los tejidos del paciente.

Se empleará la técnica Western Blot junto con los anticuerpos anti *FLAG-tag* (Antibodies, 2022) con el objetivo de identificar la SGSH sobreexpresada. Aunque la producción de la SGSH se da en el interior de la célula (ensayo en el extracto celular), comunicará con la neurona alterada mediante el proceso de corrección cruzada ya expuesto (ensayo del sobrenadante) por lo que se realizará el ensayo no solo con el extracto de MSCs, sino del sobrenadante y del cocultivo con neuronas dañadas.

Para los dos últimos, se sembrará y se dejará crecer en torno a una semana. A partir de esto se obtendrá el sobrenadante y se recogerán las células. El ensayo de extracto celular conlleva la lisis de las células y su homogeneización con un *buffer* específico y homogeneización mecánica (Taylor *et al.*, 2014) (Tabla III).

**Tabla III.** Protocolo RIPA, ejemplo de buffer de homogeneización, adaptado de Taylor *et al.*, 2014.

<b>PROTOCOLO: RIPA – buffer de homogenización</b>		
	<b>Concentración</b>	<b>Detergente</b>
<b>Tritón X-100</b>	1 %	Detergente
<b>Desoxicolato de sodio</b>	1 %	Detergente
<b>SDS</b>	0,1%	Tensoactivo
<b>NaCl</b>	150 mM	Evitar agregados proteicos
<b>Tris-HCl</b>	50 mM	Disolución tampón
<b>pH</b>	7,8	Tampón
<b>EDTA</b>	1 mM	Estabilidad: quelante
<b>Mezcla comercial de inhibidores de proteasas de Roche Applied Science</b>		<b>Inhibición de la degradación por proteasas</b>

La concentración total proteica tras la homogeneización ha de ser medida realizando el RCDCTM *Protein Assay* (Bio-Rad, 2022), técnica colorimétrica normalizada y comercializada por BioRad que permite identificar la presencia de proteínas en medios con detergentes.

Dado que el vector es no integrativo, se ha de garantizar no solo que produzca la enzima sino que esta producción se mantenga en el tiempo. El resultado obtenido nos determinará también el intervalo de inoculación de MSCs en los ensayos *in vivo* y clínicos

En el estudio de producción de la proteína morfogénica ósea o BMP2 en el artículo de Bougioukl *et al.* se estima la producción en 0,9 ng en el segundo día y 1,1 ng en el séptimo de BMP2, frente a la expresión de 0,1 ng con las MSCs sin transducir (Bougioukl *et al.*, 2020). O la interleuquina 10 en el artículo de Nitahara-Kasahara *et al.*, cuya expresión pasa de niveles despreciables a más de 10000 pg/ml (Nitahara-Kasahara *et al.*, 2021). Respecto a la duración de la sobreexpresión, en el caso de la interleuquina-10, se mide de manera indirecta por su actividad, mostrando valores muy altos hasta los tres meses (Nitahara-Kasahara *et al.*, 2021). En conclusión, se espera que, como en trabajos anteriores publicados, la expresión de la enzima se presente significativamente más alta y se mantenga constante durante los 2 – 3 meses meses que se propone como posología.

## 3.2 Ensayos de corrección cruzada

### MSCs y fibroblastos

Para comprobar que existe un efecto de corrección cruzada en las MSCs modificadas genéticamente se lleva a cabo un co-cultivo de las mismas con fibroblastos procedentes de pacientes.

Los fibroblastos se obtendrán de tejido dérmico de pacientes de MPS IIIA, realizando su procesamiento en las 24 horas posteriores a la toma de las muestras. El tejido se lavará con una solución de PBS, 5% penicilina/estreptomicina y 1% anfotericina. Tras tres lavados, se colocará en una placa Petri con PBS. Se separará la capa de tejido adiposo que pueda haber en la muestra cortando por debajo de la dermis. Del mismo modo, se eliminará la epidermis cortando justo por debajo de ella. La dermis aislada se cultivará en DMEM con 10% de FBS y 1% de GlutaMAX. Durante 10 días se incubará a 37°C, de modo que los fibroblastos de la dermis comenzarán a salir del explante. Se retirará el tejido y se cultivarán las células con normalidad hasta conseguir la confluencia necesaria (Williams *et al.*, 2020).

Una vez obtenido el cultivo de fibroblastos procedentes de donantes enfermos, se traspasarán estas células a una placa de 96 pocillos. Sobre los pocillos se colocará un *transwell* para co-cultivar los fibroblastos con deficiencia de sulfamidasa con las MSCs transfectadas, las cuales se colocarán en la parte superior del *transwell*. Una membrana semipermeable separará ambos compartimentos, haciendo que únicamente puedan traspasarla productos secretados, como pueden ser las enzimas. Este es un método ya utilizado en investigaciones sobre el uso de MSCs para la deficiencia enzimática (Müller *et al.*, 2006).

De este modo se compararán los resultados obtenidos del co-cultivo de fibroblastos con MSCs (RFP) o con MSCs (FLAG-SGSH-T2A-RFP). La forma de determinar si se está secretando de SGSH y corrección de los fibroblastos es midiendo la cantidad de heparán sulfato acumulado. Una técnica comúnmente empleada para medir la cantidad de GAGs es el uso de sulfato de sodio marcado con S-35 como trazador en el ensayo de secuestro de sulfato. Los fibroblastos se exponen al trazador a 20 µCi/mL de FBS durante una semana. Posteriormente, se tripsinizarán las células para eliminar los GAGs externos mediante sucesivos lavados con PBS. Esta solución celular se centrifugará y el pellet se resuspenderá en una disolución de 6 M urea/0,15 M fosfato sódico al 1% del detergente Triton X-100 para lisar los fibroblastos. Los extractos celulares se pasarán a través de un filtro de 0,2 µm y seguidamente se introducirán en una cromatografía de intercambio aniónico. Se lavará con una solución con 0,15 M NaCl/20 mM fosfato al 1% de Triton X-100 para eliminar el <sup>35</sup>SO<sub>4</sub>

que no se haya incorporado. De esta manera, se podrán separar los componentes que incluyan S-35 mediante un gradiente lineal de 0,15-1,5 M NaCl en 20 mM de fosfato y 1% de Triton X-100. Las fracciones obtenidas de este procedimiento se usarán para un ensayo de centelleo líquido que permitirá medir la cantidad de <sup>35</sup>S presente en la muestra, que a su vez estará unido a los GAGs, siendo extrapolable a la cantidad de heparán sulfato que habrá acumulado en los fibroblastos (Baxter *et al.*, 2002).

Se compararán los resultados obtenidos de los fibroblastos co-cultivados con MSCs (RFP), de aquellos que se han puesto en contacto con MSCs (FLAG-SGSH-T2A-RFP). Se esperarían menos niveles de S-35 y, por tanto, menos niveles de GAGs en el segundo caso. Este efecto se debería al proceso de corrección cruzada en el que la SGSH secretada por las células mesenquimales atraviesan la membrana del transwell y entra al interior de los fibroblastos gracias al MPR, revirtiendo la cantidad de heparán sulfato a niveles fisiológicos.

### MSCs y neuronas

Este experimento *in vitro* sobre la capacidad de corrección cruzada también se debe realizar con neuronas para asegurar el éxito de la terapia en SNC. Para poder usar neuronas con la mutación procedentes de pacientes del Síndrome de Sanfilippo tipo A se transdiferenciarán fibroblastos de los mismos a neuronas.

El mecanismo puede estar basado en múltiples aproximaciones, como el uso de factores de transcripción, microRNAs, proteínas o pequeñas moléculas (Han *et al.*, 2021). El método elegido para este proyecto es el uso de factores de transcripción por ser el más estudiado. Aquellos necesarios para conseguir la reprogramación hacia el linaje neuronal son ASCL1, BRN2, MYT1L y NEUROD1 (Baek *et al.*, 2016).

A continuación, se debe elegir el método de vehiculización de los factores a los fibroblastos. Los avances en este campo han desarrollado procedimientos rápidos que permiten una expresión transitoria, deseada en este caso concreto. Entre ellos puede destacar el uso de vectores poliméricos como la polietilenimina (PEI). Su naturaleza catiónica le permite unirse a ácidos nucleicos cargados negativamente y desencadenar el proceso de liberación del endosoma. Las nanopartículas PEI-DNA ya han sido probadas y han demostrado su eficiencia de reprogramación celular. Además, el PEI se ha conjugado con óxido de grafeno (GO) para mejorar la eficiencia de transfección, así como proteger a las moléculas de DNA o RNA que porten de la degradación por nucleasas. Consecuentemente, los complejos GO-PEI han resultado muy eficaces para vehiculizar mRNA a células somáticas e inducir su reprogramación a neuronas (Baek *et al.*, 2016).

Este procedimiento comenzará con la fabricación de partículas GO-PEI. 50 mL de PEI de 25 kDa a 1mg/mL se añadirán lentamente a una solución de 100 mL a 0,1 mg/mL de GO en agua desionizada. Posteriormente se agitará la mezcla por ultrasonificación durante 10 min y se dejará agitando durante la noche. Se lavará varias veces por centrifugación con agua desionizada y finalmente se resuspenderá, de nuevo, en agua desionizada (Baek *et al.*, 2016).

Para la formación de complejos GO-PEI-mRNA se obtendrá el mRNA de ASCL1, BRN2, MYT1L y NEUROD1 mediante transcripción *in vitro* y se mezclarán con las partículas GO-PEI. Previamente a la transfección, la mezcla se incubará a 4°C durante 20 min. Una vez obtenidas las nanopartículas, se tratarán los fibroblastos aislados de pacientes a un 60% de confluencia con 25,2 µg/mL de GO-PEI-mRNA (Baek *et al.*, 2016).

Tras 20 días se comprobará la transdiferenciación de fibroblastos a neuronas mediante ensayos de inmunocitoquímica a través de anticuerpos anti-TUJ1, anti-MAP2 y anti-vGLUT1, todos ellos marcadores neuronales (Baek *et al.*, 2016).

Una vez obtenidas neuronas inducidas de fibroblastos procedentes de la dermis de pacientes, se seguiría el mismo protocolo de co-cultivo con MSCs transducidas anteriormente explicado. Tras la cuantificación de la cantidad de GAGs por el ensayo de secuestro de sulfato (descrito en el apartado anterior de co-cultivo de MSCs y fibroblastos), se compararán los niveles obtenidos en neuronas co-cultivadas con MSCs (RFP) con los niveles en neuronas co-cultivadas con MSCs (FLAG-SGSH-T2A-RFP). De nuevo, se esperará observar una corrección de los niveles de heparán sulfato por el mecanismo de la corrección cruzada.

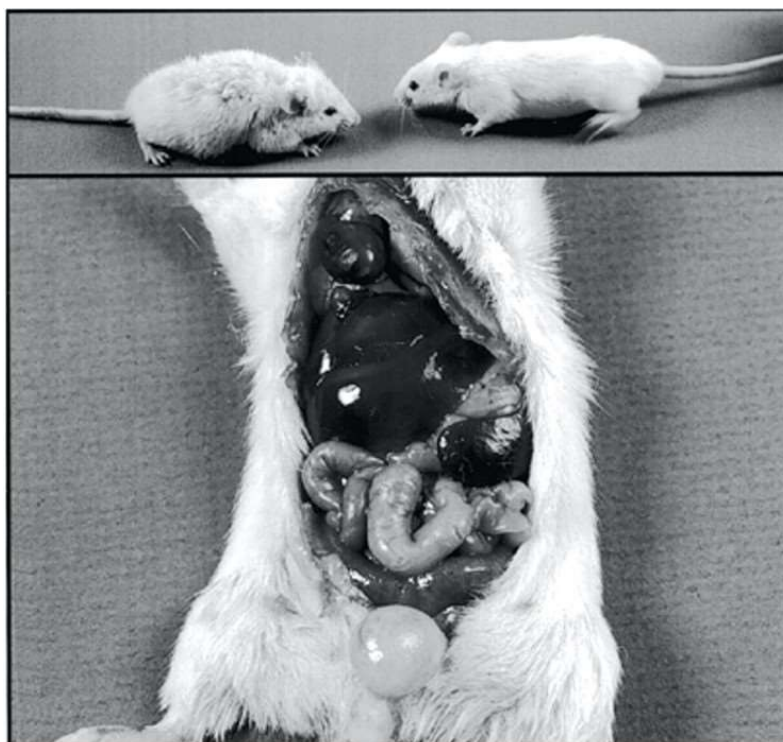
#### **4 Estudios *in vivo***

Los estudios *in vivo* constarán de dos etapas. En la primera de ellas se utilizará un modelo animal de roedor; y, una vez que los estudios han mostrado buenos resultados, en el ensayo preclínico, se realizarán de nuevo en un modelo animal mayor. Además, se trata de un tratamiento que requiere dos vías de administración, por lo que será necesario testar los distintos parámetros para las dos vías.

El objetivo principal de este ensayo es llevar a cabo pruebas de toxicidad, dosis, eficacia y tropismo, con el fin de determinar las dosis adecuadas y evaluar los posibles riesgos o efectos adversos antes de comenzar el ensayo clínico.

#### 4.1 Modelo animal de roedor

Para el modelo de roedor se utilizarán ratones adquiridos en *The Jackson Laboratory*. La cepa de ratón *wildtype* será C57BL/6J, ya que es la cepa pura más utilizada y es permisiva para la expresión máxima de la mayoría de mutaciones. Se trata de ratones negros, refractarios a muchos tipos de tumores, con una baja densidad ósea y que desarrollan pérdida de audición asociada a la edad. Además, son susceptibles a obesidad, diabetes tipo 2 y aterosclerosis. La cepa mutante para el síndrome de Sanfilippo es B6.Cg-Sgsh<sup>mps3a</sup>/PstJ, ya que porta una mutación en el gen SGSH. Tanto los ratones *wildtype* como los mutados pertenecen a la misma camada, ya que provienen de padres heterocigotos. Como se observa en la Figura 5, donde se ven ratones mutados para Sanfilippo, en este caso blancos, se caracterizan por poseer un pelaje desaliñado, postura encorvada, opacidad corneal y actividad reducida. Además, tienen una gran acumulación de heparán sulfato en los lisosomas, que se manifiesta en mayor medida en el tejido nervioso, el hígado y, en menor medida, en el bazo (<https://www.jax.org/strain/003780>).



**Figura 5.** Ratón afectado por el Síndrome de Sanfilippo y compañero de camada normal. A) Fotografía de un ratón afectado por MPS tipo III A (izquierda) y su compañero de camada normal (derecha). B) Ratón adulto afectado por MPS tipo III A que muestra vejiga distendida y bazo agrandado. (Bhaumik *et al.*, 1999).



Para el diseño del ensayo será necesario determinar el número de animales que ha de utilizarse en cada estudio, y para ello, habrá que usar un método estadístico que permitirá determinar el tamaño de muestra de manera que este sea estadísticamente significativo, pero respete el principio de reducción (de las 3 R: reemplazo, reducción y refinamiento). Para este propósito existen distintos programas informáticos que lo calculan. El uso de un tamaño de muestra estadísticamente incorrecto puede dar lugar a problemas éticos, resultados inadecuados, pérdida de tiempo y pérdida de dinero (Serdar *et al.*, 2021).

Por otro lado, habrá que tener en cuenta que la enfermedad que se estudia tiene un bajo pronóstico vital por lo que podría fallecer un determinado número de animales antes de sacrificarlos y, por cuestiones éticas, ha de ser el menor número posible.

#### **4.1.1 Administración de las células mesenquimales vía intranasal**

Como se mencionó anteriormente, el síndrome de Sanfilippo deteriora mayoritariamente el SNC, por lo que alcanzar el tejido nervioso es importante a la hora de obtener una buena eficacia terapéutica. Se ha visto que las MSCs tienen un alto tropismo por zonas inflamadas, sin embargo, a pesar de que también se sabe que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, la cantidad de estas que alcanzaría el cerebro podría no ser suficiente si se administra exclusivamente vía intravenosa (Yarygin *et al.*, 2021). Por ello, en este proyecto se propone utilizar la vía intranasal para administrar las células madre en el cerebro.

Se ha visto que existen dos rutas principales mediante las cuales las células pueden alcanzar el cerebro a través de la vía intranasal, la ruta directa y la indirecta. Estas, pueden hacerlo por una de las dos, o bien, por las dos a la vez. La ruta indirecta consiste en que las células son absorbidas por la mucosa nasal y alcanzan la circulación sistémica, en contraposición, a través de la ruta directa las células alcanzan el cerebro mediante el nervio olfativo o trigémino (Costa *et al.*, 2021).

A través de la ruta del nervio olfatorio, las células pueden viajar por la vía intracelular o extracelular. La vía intracelular se basa en la internalización de las células madre en la neurona olfativa y su transporte a través del flujo axonal. Por otro lado, las células madre pueden alcanzar el cerebro a través de las células de envoltura olfatoria que rodean los nervios olfatorios. Esta ruta es más rápida. Además, existe otra vía que es la vascular, mediante la cual las células madre utilizan los vasos sanguíneos como andamio para su migración a través de una interacción con la matriz extracelular y los astrocitos vasculares (Jiang *et al.*, 2011).

La ruta del nervio trigémino se basa en el mismo principio que la ruta del nervio olfativo. Las células viajan a través del transporte axonal gracias a la endocitosis. Las células utilizan simultáneamente las distintas rutas para alcanzar el cerebro, ya que estas no son excluyentes entre sí (Costa *et al.*, 2021).

Para la administración de las MSCs en los ratones, será necesario apoyarlos sobre un rollo de gasa que se colocará debajo de sus cuellos para que se reclinen sobre sus espaldas. Además, se les inmovilizará la cabeza, que ha de estar en un ángulo de aproximadamente 70 o 90° (Jiang *et al.*, 2011). En primer lugar, se les anestesiará con isoflurano mediante cámara de inducción. Ha de usarse una máscara compatible con ratones que se puede colocar alrededor de la nariz y la boca para mantener la anestesia constante. Se tratará la nariz de los ratones con 4 µl de 100U/10 µl de hialuronidasa para disminuir la función de barrera de la mucosa nasofaríngea y facilitar el acceso de las células madre al cerebro. A continuación, se inyectará lentamente en la cavidad nasal con un tubo delgado de 0,5 a 0,7 cm de largo conectado a una microjeringa. Posteriormente, se inyectará la dosis adecuada de suspensión celular (Lu *et al.*, 2021).

#### **a) Ensayo de tropismo**

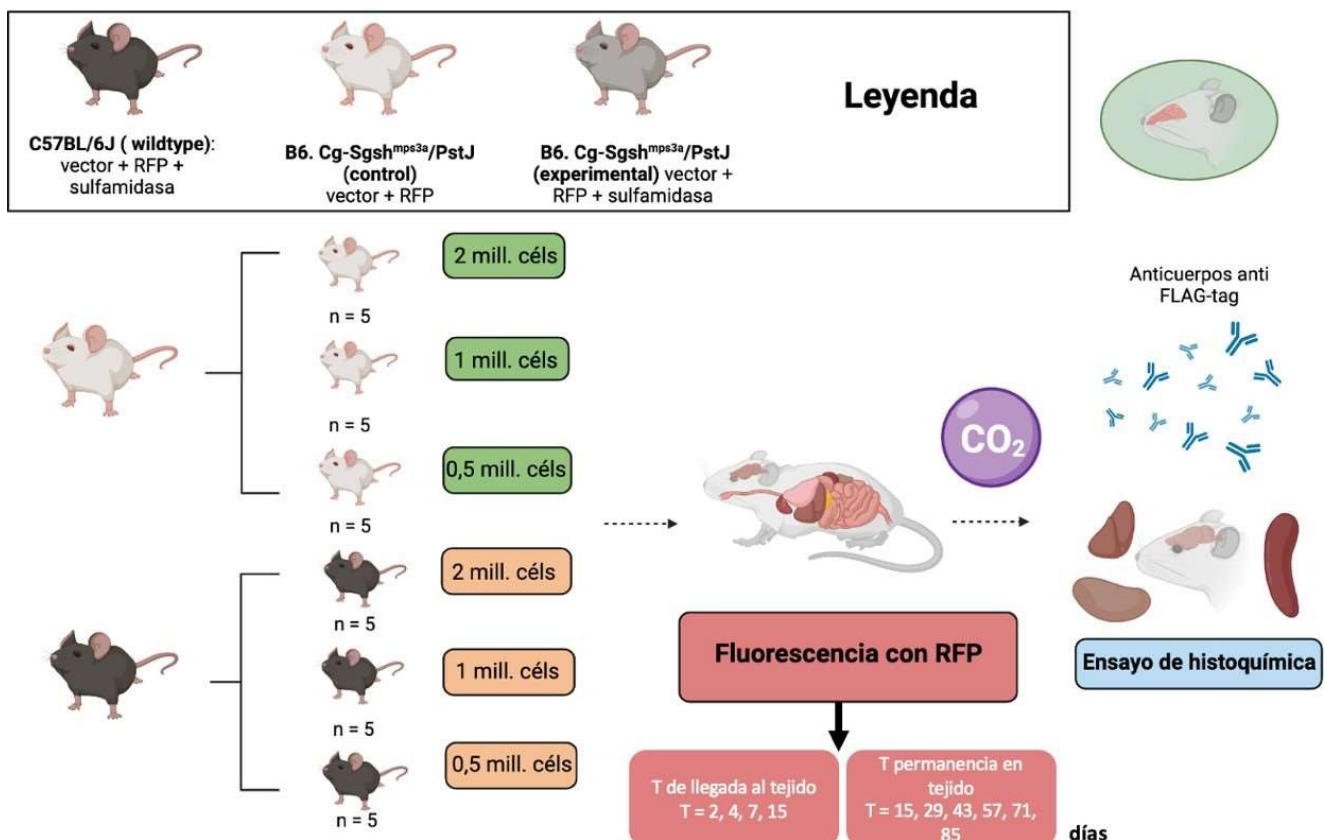
Los estudios de biodistribución son importantísimos para cualquier terapia celular puesto que se ha de garantizar la llegada de las células a la zona de interés, así como su llegada de manera funcional. Se propone un estudio de luminiscencia con RFP. Es una proteína que emite fluorescencia en la zona roja del espectro visible, y va a permitir detectar no sólo dónde se ubican las células madre sino su viabilidad, aspecto fundamental en este punto del estudio. Para el revelado, se usará el sistema IVIS *Spectrum*, que ofrece una tomografía en 3D de pequeños animales, detectando no solo la localización, sino la concentración de la proteína fluorescente. La importancia de este experimento radica en que, necesariamente, la MSC ha de ser funcional para expresar la proteína RFP (Perkinelmer, 2022).

La observación, que al ser un método no invasivo se podrá realizar de manera periódica, comenzará a realizarse a las 48 horas de la administración para garantizar la migración de la célula y el tiempo suficiente como para expresar proteínas (López-Santalla *et al.*, 2017).

Se utilizarán los modelos murino *wildtype* C57BL/6J y control mutado B6.Cg-Sgsh<sup>mps3a</sup>/PstJ, comparados estos para establecer la diferencia entre el tropismo de las MSCs hacia tejidos sanos y dañados por la enfermedad.

La administración suele ser de 0,5 a 2 millones, para evitar embolia pulmonar, aproximadamente a 100 - 200 millones de MSCs/kg (Sensebé *and* Fleury-Cappelloso, 2013).

Por lo que se fijará dos millones de células como dosis máxima y se plantearán dos dosis más: un millón de células y medio millón de células. Aunque la extrapolación en casos de terapias avanzadas resulta complicada, este ensayo supone el intervalo a partir del cual, en ensayos posteriores, se fijen dosis más acordes a la administración humana. Se realizarán los análisis de fluorescencia en diferentes tiempos, tiempos determinados en función de la biodistribución observada en la literatura. Finalmente, se sacrificará a los sujetos, extirpando cerebro, hígado, bazo y riñones (órganos más afectados por la enfermedad) y se realizará una reacción de inmunohistoquímica usando anticuerpos anti *FLAG-tag* para observar la acumulación remanente (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema del ensayo de biodistribución en ratones *wildtype* C57BL/6J y control mutado B6.Cg-Sgsh<sup>mps3a</sup>/PstJ, vía intranasal. A cada grupo de cinco se le administra una de las tres dosis. Para la fluorescencia, se diferencian dos periodos: tiempo de llegada de las MSCs al tejido y tiempo que son capaces de permanecer viables en esos tejidos. Finalmente se realiza una inmunohistoquímica para observar posible remanencias de MSCs.

Con este ensayo se espera confirmar lo entendido en la literatura: una migración más directa y localizada, para que la cantidad de MSCs que acaben alcanzando el tejido nervioso sea más alto. Así como el aumento de afinidad por estas células hacia zonas inflamadas y apoptóticas (modelo de la enfermedad).

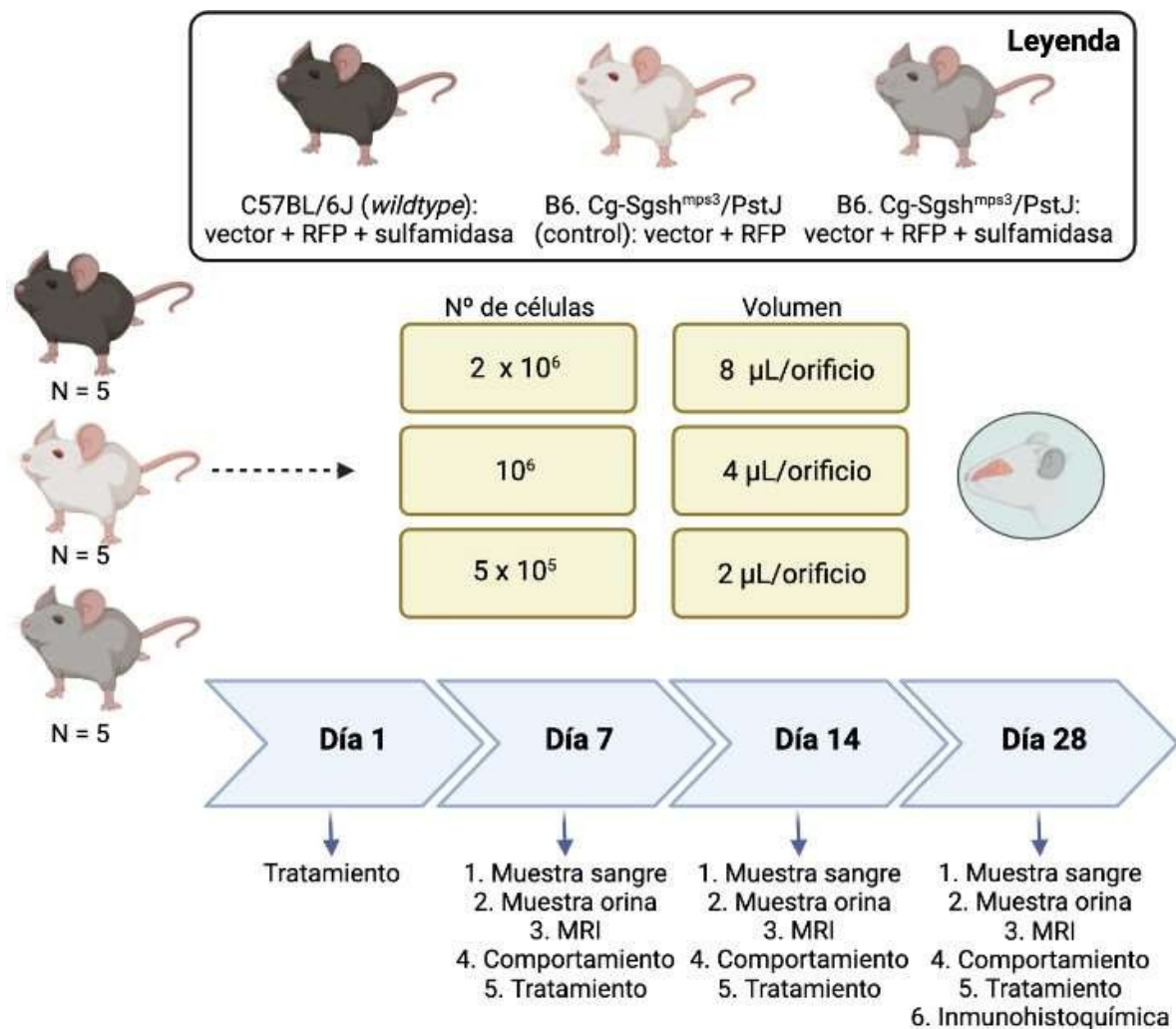
La dosis se fija, de manera hipotética, en el millón de células para su uso en ensayos posteriores de eficacia y dosificación.

## **b) Ensayo de dosis- eficacia- toxicidad**

Basándose en los ensayos de Lu *et al.*, en los que administran vía intranasal células madre neuronales para el tratamiento de Alzheimer; la dosis de suspensión celular que observan adecuada es de 8 µl (1x10<sup>6</sup> células, 4 µl en cada orificio) (Lu *et al.*, 2021). Además, esta cantidad coincide con la dosis de referencia estudiada en el ensayo de biodistribución, por lo que se tomará de referencia en el presente estudio. Es importante saber que, si se añade un volumen demasiado grande, se producirá un depósito de células en la nasofaringe, lo que puede provocar dificultad respiratoria; y si, por el contrario, el volumen es demasiado pequeño, el depósito se producirá principalmente en el epitelio respiratorio de la cavidad nasal (Jiang *et al.*, 2011).

Además, como se mencionó anteriormente, el tratamiento es repetitivo y será necesario administrarlo cada determinado tiempo. Como se lleva a cabo en los ensayos de Lu *et al.*, se administrará en los ratones una vez a la semana durante cuatro semanas.

Antes de cada administración de las células en los ratones, a partir de la segunda vez, se extraerán muestras de sangre, de orina y se realizarán distintos estudios para observar la eficacia y toxicidad del tratamiento. La muestra de sangre servirá para medir niveles de proteína C reactiva y citoquinas inflamatorias, con el fin de observar si disminuye la inflamación, o, por el contrario, aumenta. Por otro lado, se medirán los niveles de GAGs en orina, para ver si estos disminuyen tras el tratamiento. Una disminución de estos se relacionaría con una buena eficacia. A través de imágenes de resonancia magnética (MRI), se observará si existen depósitos de heparán sulfato en el cerebro u otros órganos. Además, se realizará un estudio de comportamiento para detectar anomalías o mejoras en este.



**Figura 7.** Esquema del diseño experimental del ensayo de eficacia y toxicidad del tratamiento vía intranasal en ratones. A los tres grupos de ratones se les administrarán las tres dosis.

Como se menciona en el párrafo anterior, el estudio de eficacia se llevará a cabo con la medición de distintos parámetros. Sin embargo, se complementará mediante un ensayo de tasa de supervivencia, de la misma manera que en los ensayos llevados a cabo por Li *et al*, donde utilizan MSCs para el tratamiento de la fibrosis pulmonar (Li *et al.*, 2021). De manera habitual, los ratones con Síndrome de Sanfilippo fallecen entre los 7 y 10 meses de edad (<https://www.jax.org/strain/003780>), comparado con los ratones *wildtype* que viven entre 2 y 3 años (<https://www.jax.org/strain/000664>). El estudio consistirá en comparar la vida de los ratones mutados tratados y los ratones *wildtype*. Un aumento en la esperanza de vida de los ratones con la SGSH, supondría una buena eficacia; en el caso contrario, se correlacionaría con una nula o baja eficacia.

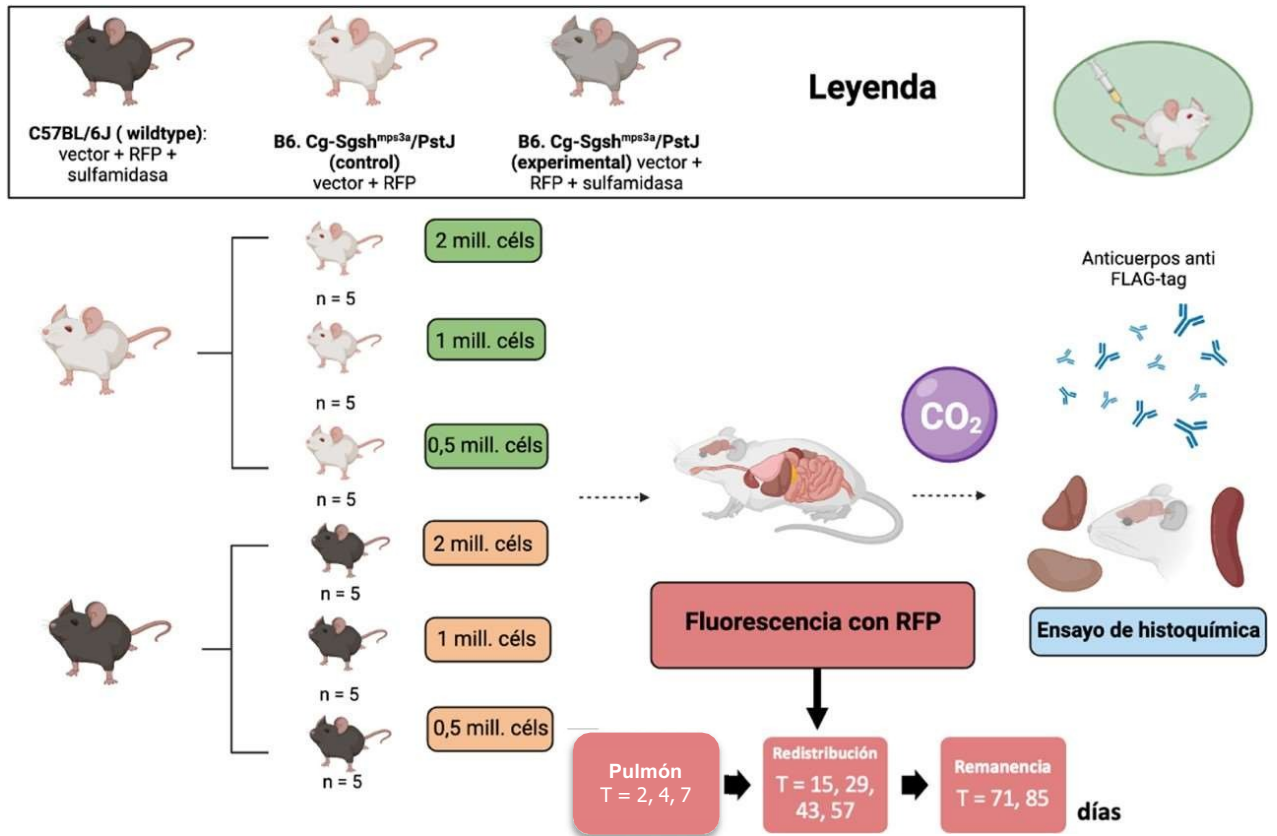
La proteína C reactiva es una proteína inflamatoria que aumenta hasta 1000 veces en sitios de infección e inflamación y se encuentra en mayor medida en suero. Además, existe una estrecha relación entre la presencia de esta proteína y determinadas citoquinas proinflamatorias, principalmente la IL-6, IL-8 y TNF-  $\alpha$ . Por ello, como se explica en apartados anteriores, ya que en la enfermedad de Sanfilippo existe inflamación, se medirá la concentración de proteína C y de dichas citoquinas en sangre antes de cada nuevo tratamiento (Sproston & Ashworth, 2018). Se llevará a cabo mediante un sistema que utiliza anticuerpos conjugados con estreptavidina y anticuerpos conjugados con nanopartículas de oro. El dispositivo de detección posee una superficie biotinilada para medición óptica. La unión de los dos anticuerpos a la proteína C forma inmunocomplejos, que se pegan a la placa mediante unión biotina-estreptavidina. Midiendo cambios en el valor de reflectancia se mide la cantidad de señal, que cuanto mayor es, mayor la cantidad de analito (Ashiba *et al.*, 2020). Por otro lado, para la detección de GAGs en orina, se realizará una electroforesis de alta resolución (Bhaumik *et al.*, 1999). Una disminución de los niveles se relacionaría con una buena eficacia. En cuanto al comportamiento, se conoce que los ratones afectados tienden a caminar en círculos, por lo tanto, el test consistiría en observar si existe una mejora y comienzan a caminar normal (Bhaumik *et al.*, 1999).

#### **4.1.2 Administración de las células mesenquimales vía intravenosa**

Como ya se ha comentado, en el síndrome de Sanfilippo, aunque el SNC es el más afectado, en un estadio de la enfermedad más avanzado, existen otros órganos periféricos como el hígado y el bazo que también se ven lesionados. Para poder corregir dichas células mediante la terapia que en este trabajo se propone administrar las MSCs por vía sistémica para que alcancen dichos órganos. Para tal propósito se administrarán las células vía intravenosa. En el caso de los ratones, esta se llevará a cabo a través de la vena de la cola.

##### **a) Ensayo de tropismo**

Se repite la técnica descrita anteriormente, con el fin de observar la biodistribución de las células cuando estas se administran vía intravenosa.



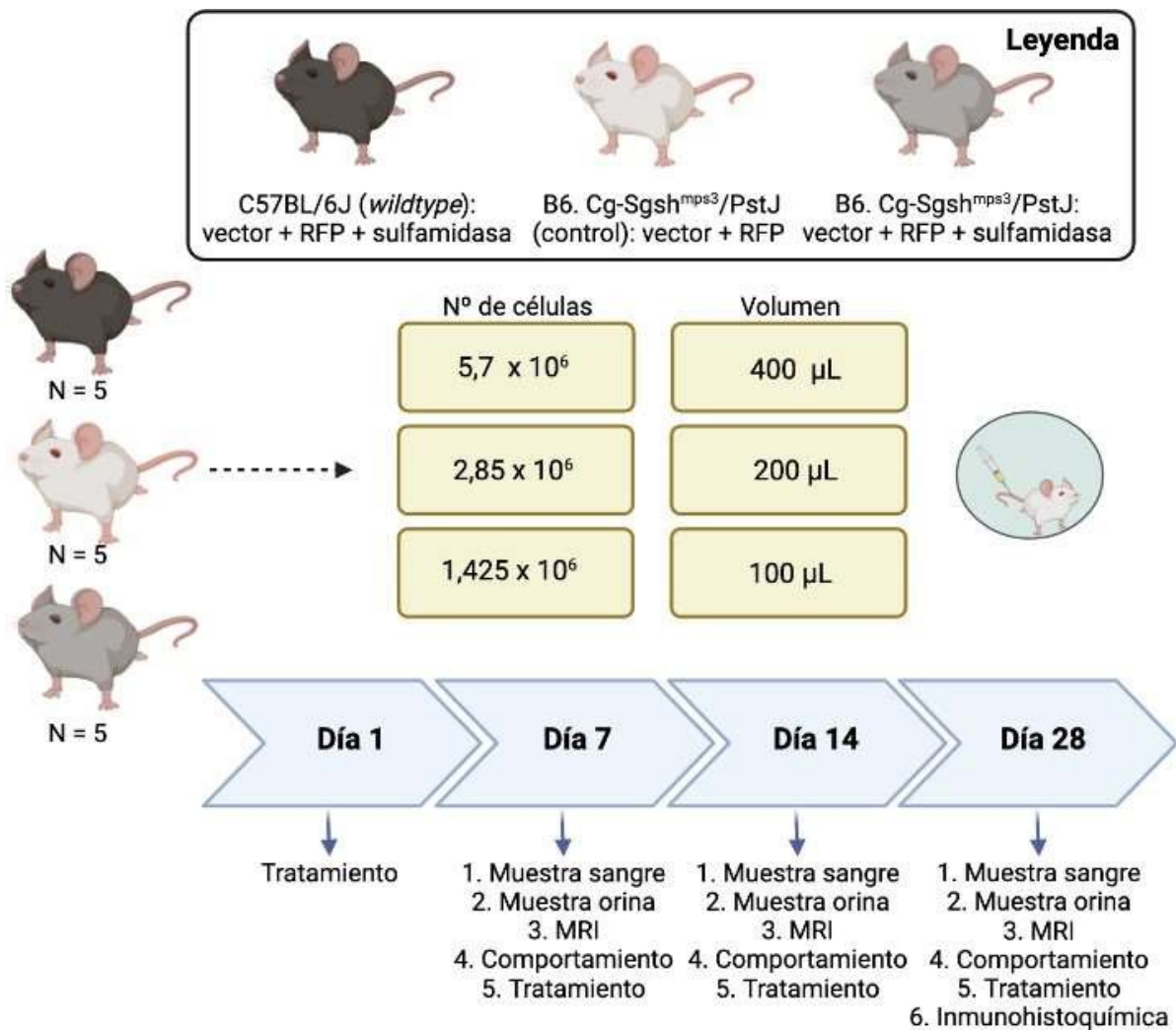
**Figura 8.** Esquema del ensayo de biodistribución en ratones wildtype C57BL/6J y control mutado B6.Cg-Sgsh<sup>mps3a</sup>/PstJ, vía intravenosa. A cada grupo de cinco se le administra una de las tres dosis. Para la fluorescencia, se diferencian tres periodos: tiempo de llegada y permanencia en pulmón, tiempo de redistribución a otros órganos y tiempo de remanencia. Finalmente se realiza una inmunohistoquímica para observar posibles remanencias de MSCs.

En la administración intravenosa se espera observar una primera estación a nivel pulmonar durante la primera semana y una posterior redistribución que se mantenga en torno a dos meses en órganos como cerebro, hígado o bazo.

### b) Ensayo de dosis- eficacia- toxicidad

En base a las dosis probadas en el ensayo de biodistribución, mencionadas anteriormente, la cantidad de células a administrar vía intravenosa es de entre 100 y 200 millones de MSCs por kg. El peso medio de los ratones es de 19 g, por lo que, si se administraran  $150 \times 10^6$  MSCs por kg, la dosis de referencia será  $2,85 \times 10^6$  MSCs.

La dosis de referencia se diluirá en 200  $\mu$ l de solución salina (0,9 % NaCl) (Neves *et al.*, 2021).



**Figura 9.** Esquema del diseño experimental del ensayo de eficacia y toxicidad del tratamiento vía intravenosa en ratones. A los tres grupos de ratones se les administrarán las tres dosis.

De la misma manera que en el ensayo de la administración de las células por vía intranasal, la eficacia se estudiará, por un lado, mediante un ensayo de tasa de supervivencia (Li *et al.*, 2021); y, por otro lado, se medirán los niveles de proteína C reactiva y citoquinas en sangre y se cuantificarán los niveles de GAGs en orina. Por otra parte, en cuanto a la toxicidad, de manera análoga a lo que se comenta anteriormente, es necesario controlar la aparición de tumores o depósitos de heparán sulfato mediante la realización de MRI. Por último, se estudiarán también anomalías o mejoras en el comportamiento, como se describe en el estudio anterior.

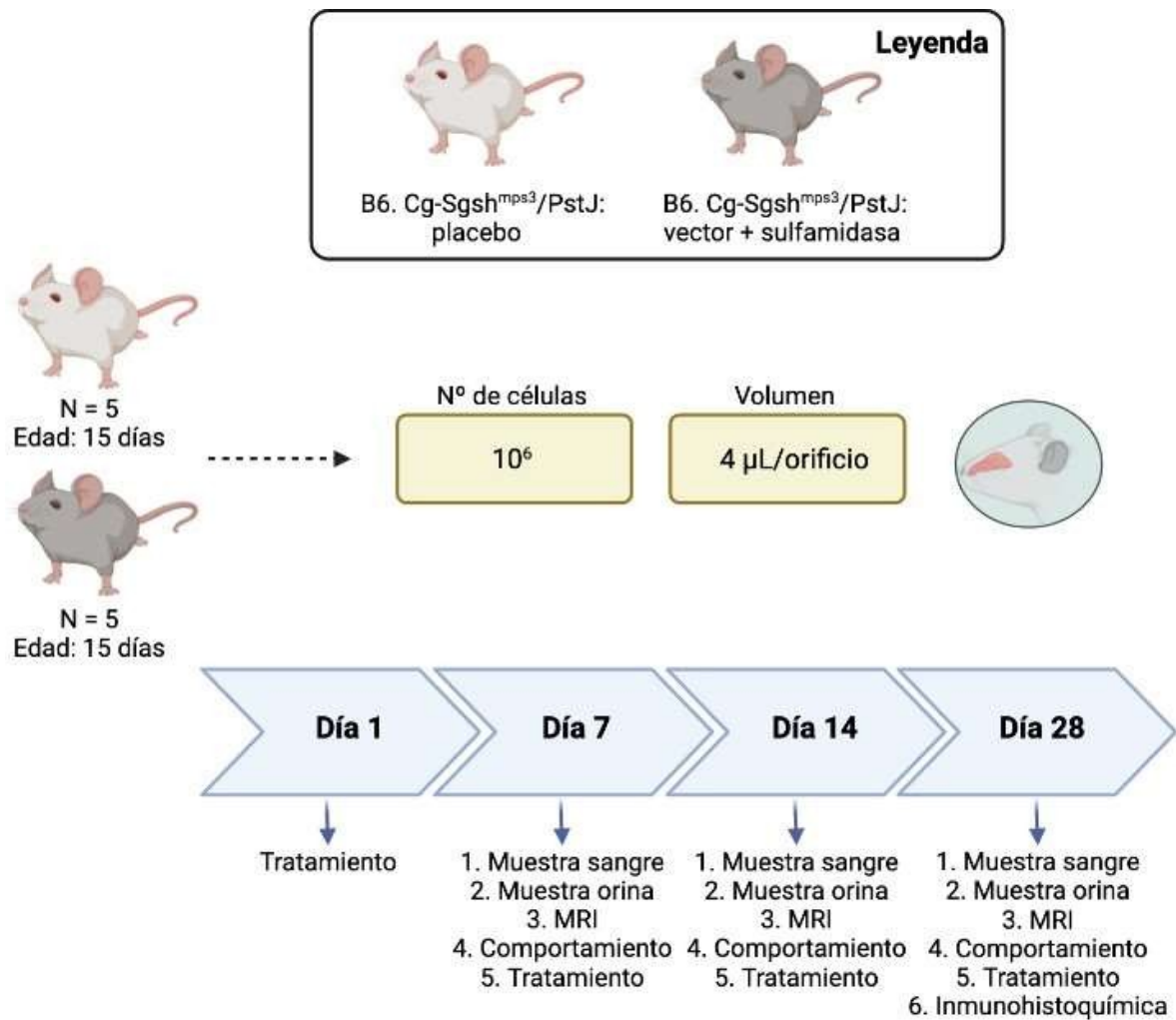


## **5 Ensayo preclínico**

Una vez realizados los estudios de biodistribución, dosis, eficacia y toxicidad en ratones, se procede a comenzar el ensayo preclínico, sin el vector terapéutico ni flag. En él, se repetirán estudios de toxicidad y eficacia en ratones, pero con la dosis elegida como la más adecuada. Además, se llevarán a cabo los mismos estudios en un modelo animal superior. Constará de dos fases, en una de ellas se utilizarán animales de pequeña edad en los que se administrarán las células vía intranasal, ya que aún no padecen un daño sistémico relevante. En la otra fase, se usarán animales mayores a los que se les administrarán las células tanto por vía intranasal como intravenosa, ya que estos poseen una mayor lesión de órganos periféricos.

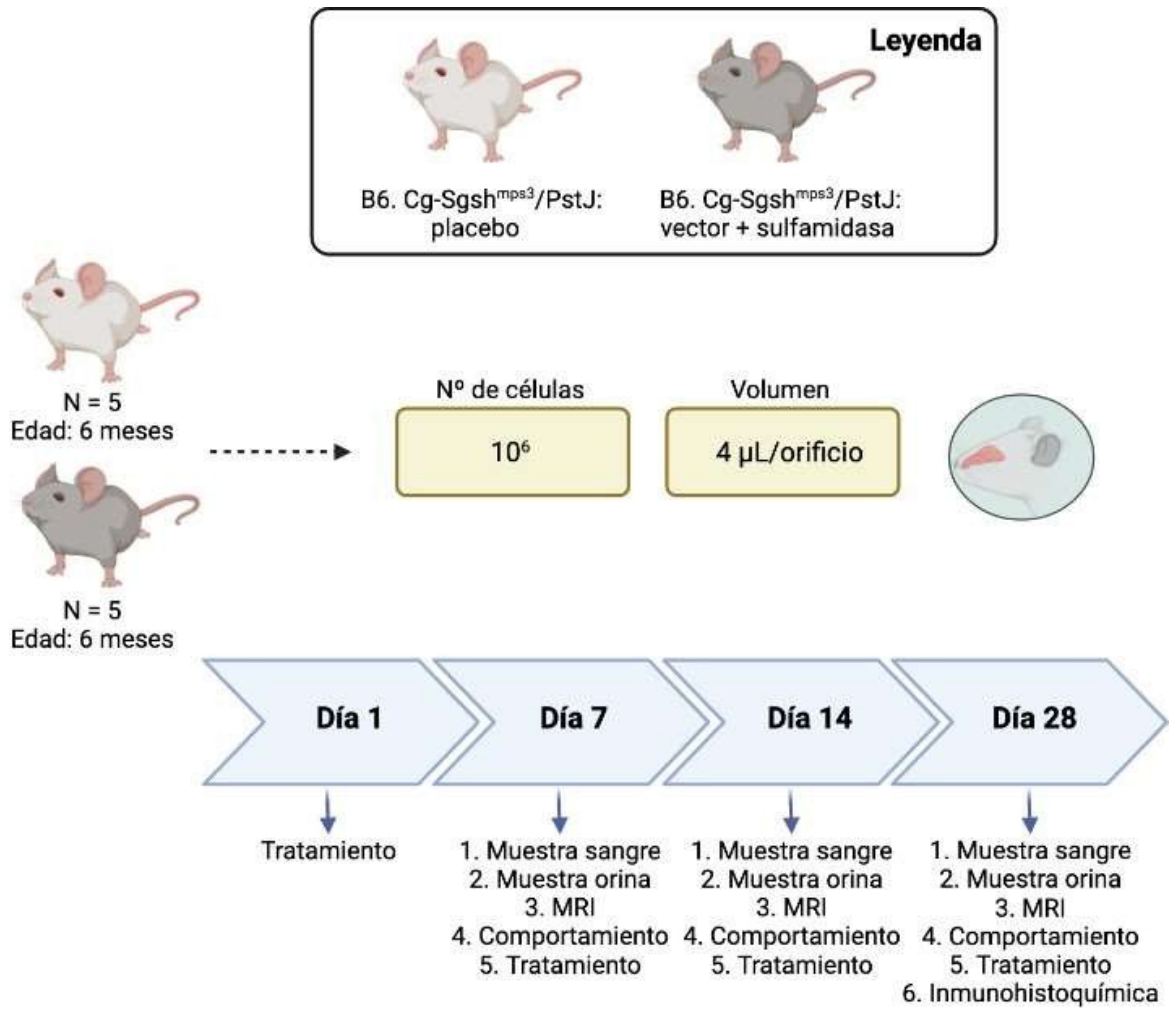
### **5.1 Ratones**

En primer lugar, se llevarán a cabo estudios de eficacia y toxicidad en ratones de 15 días, ya que equivale aproximadamente a un año de humanos. En estos, se les administrará la dosis de células definitiva exclusivamente vía intranasal, ya que son demasiado jóvenes y aún no tienen órganos periféricos dañados (Figura 10).

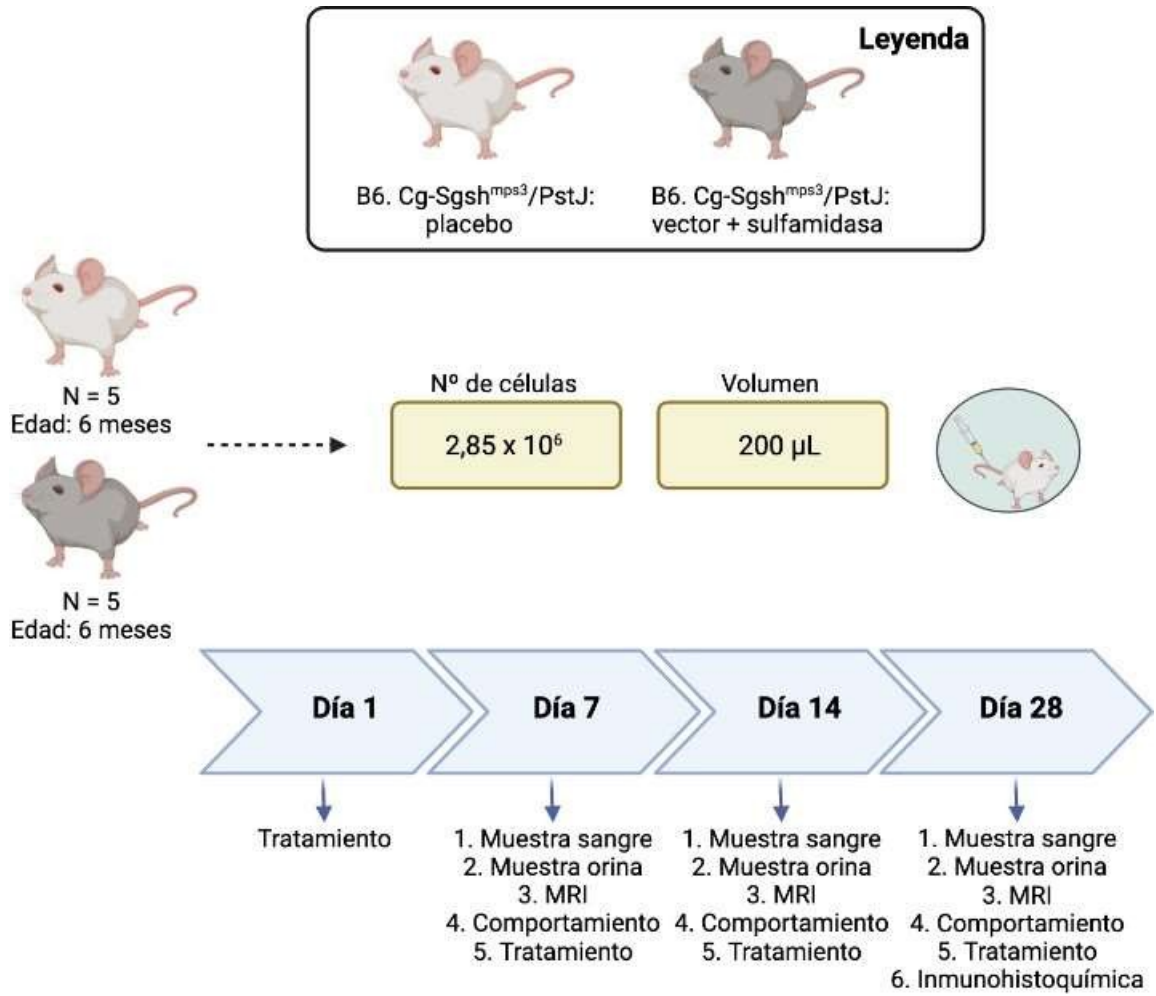


**Figura 10.** Esquema del diseño experimental del ensayo preclínico en ratones de 15 días vía intranasal con la dosis final.

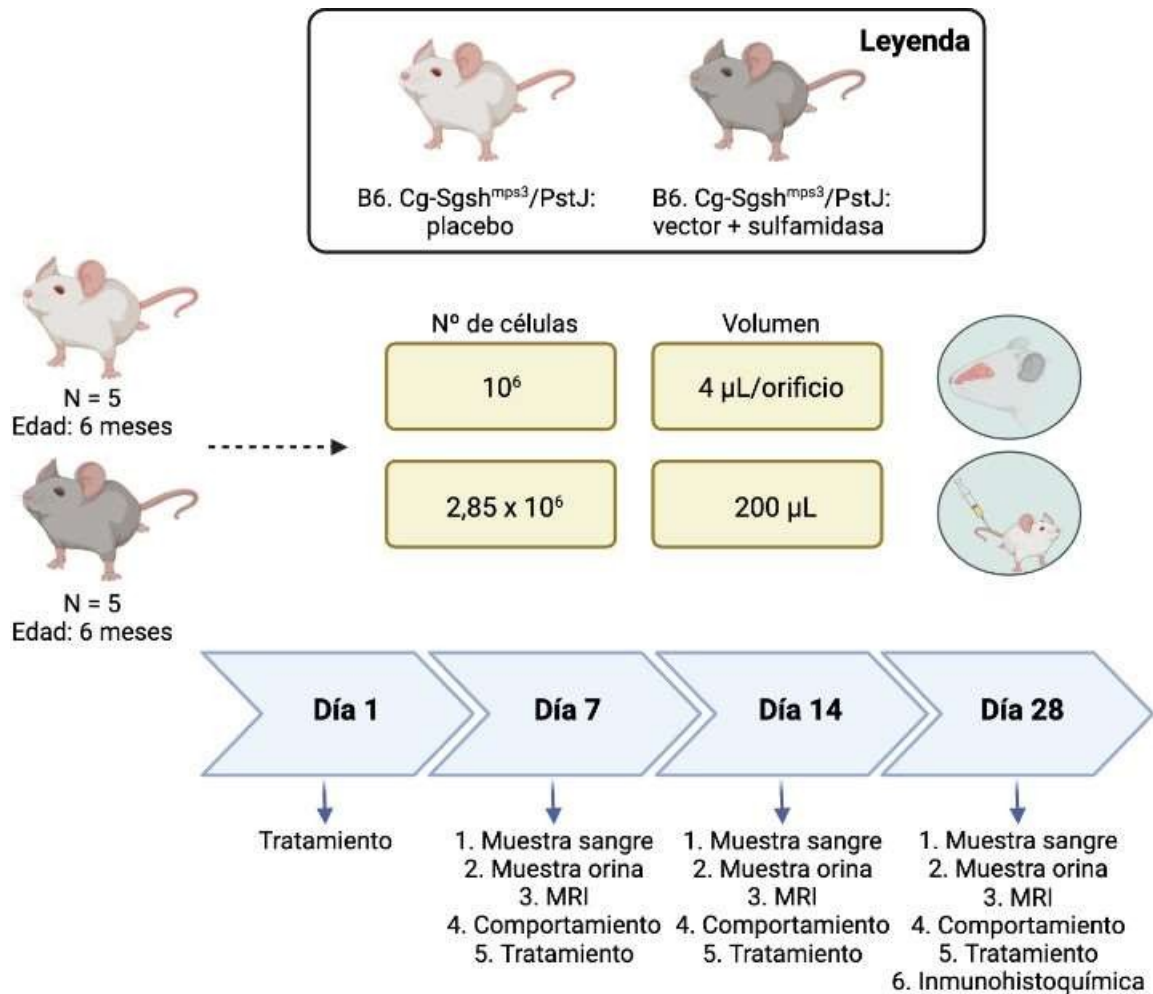
Por otro lado, se probará la dosis final para la vía intranasal e intravenosa en ratones de 6 meses, que equivale aproximadamente a 14 años humanos. Los ensayos para cada vía se harán de manera independiente, y después, de manera conjunta, con el fin de ver si un tratamiento combinado aumenta la eficacia, ya que estos sí poseen daño en órganos periféricos.



**Figura 11.** Esquema del diseño experimental del ensayo preclínico en ratones de 6 meses vía intranasal con la dosis final.



**Figura 12.** Esquema del diseño experimental del ensayo preclínico en ratones de 6 meses vía intravenosa con la dosis final.



**Figura 13.** Esquema del diseño experimental del ensayo preclínico en ratones de 6 meses vía intranasal combinado con intravenosa con las dosis finales.

Como se muestra en las figuras 11,12 y 13, en el ensayo preclínico se repetirán los estudios de eficacia y toxicidad mediante todas las pruebas descritas en los ensayos previos (detección de proteína C reactiva y citoquinas en sangre, medición de niveles de GAGs en orina, MRI de órganos afectados y ensayo de comportamiento).

Por último, igual que en los estudios de biodistribución, se sacrificará a los sujetos, extirpando cerebro, hígado, bazo y riñones (órganos más afectados por la enfermedad) y se realizará una reacción de inmunohistoquímica usando anticuerpos anti-SGSH marcados fluorescentemente para ver si realmente ha alcanzado los órganos diana.

## 5.2 Modelo animal superior

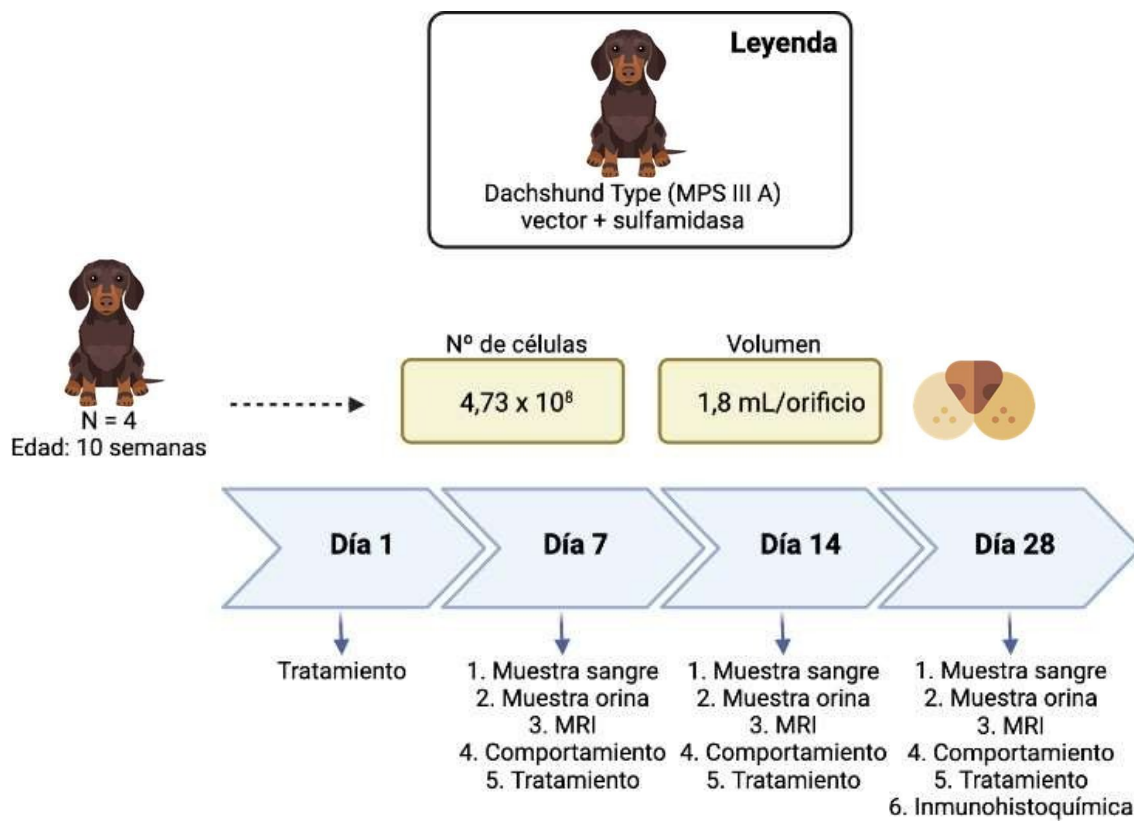
Para el modelo animal superior se utilizarán perros salchicha [Dachshund Type (MPS IIIA)], que serán adquiridos de Animallabs®. Estos perros, al igual que los ratones mutados, portan también una mutación en el gen *Sgsh*. Se caracterizan por presentar ataxia espinocerebelosa, lo que les provoca tropiezos y caídas frecuentes. A medida que avanza la enfermedad, comienzan a balancearse de un lado a otro volviéndose incapaces de subir escaleras. En cuanto al examen histológico, presentan lesiones en la médula espinal, tronco encefálico y degeneración neuronal cerebelosa. Para el grupo control *wildtype*, los perros a utilizar serán los de la misma camada pero no afectados (Aronovich *et al.*, 2000).

En el caso de los perros, las restricciones éticas son mucho mayores ya que, entre otras cosas, estos tienen una esperanza de vida mucho mayor. Por lo tanto, el tamaño de muestra será menor, así como el número de ensayos.

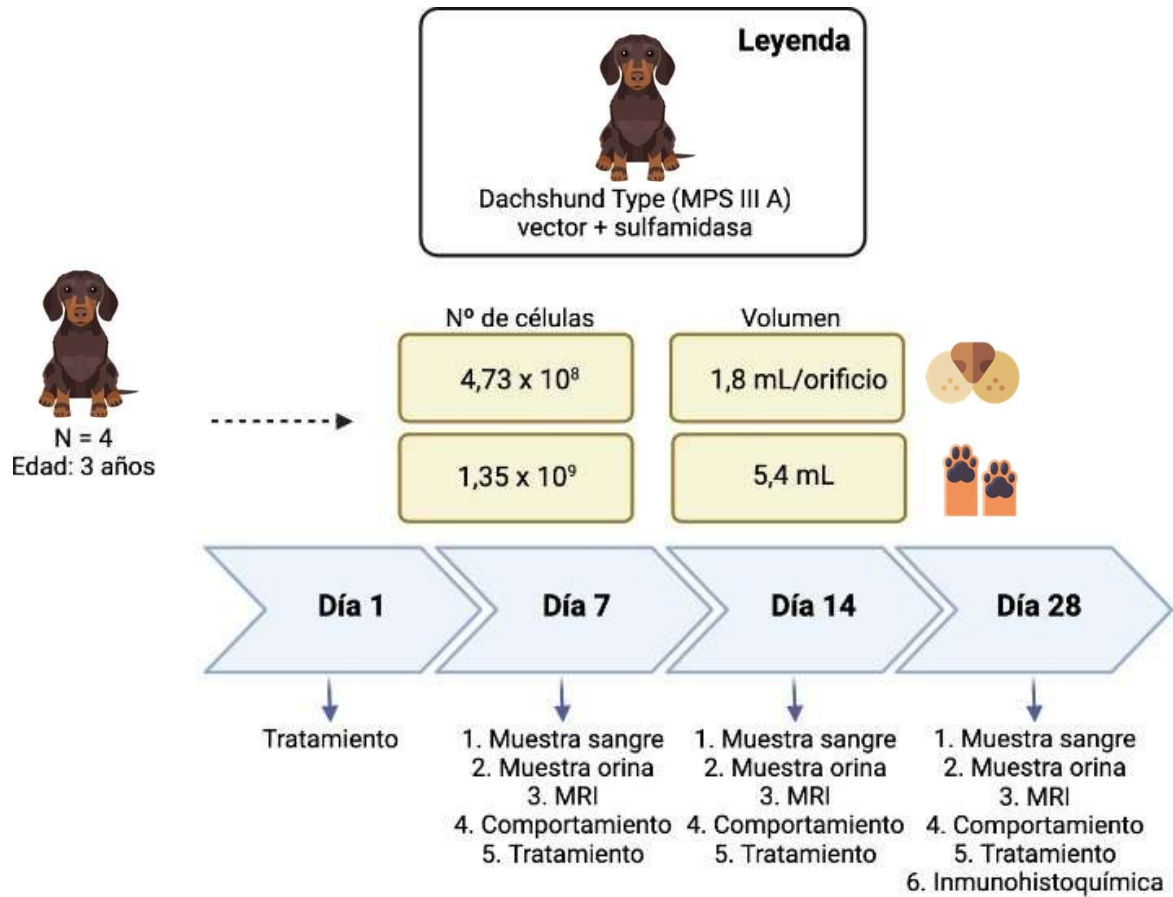
Para la administración intranasal de las células en perros, se insertará una cánula unida a un tubo en cada una de las fosas nasales a una profundidad de 19 mm, sin anestesia (Dretchen *et al.*, 2020).

En este caso, debido a que la terapia propuesta es muy novedosa y no se ha llevado a cabo antes, no hay suficiente bibliografía sobre la que basarse en cuanto a dosis de células intranasal en perros. Por lo tanto, se extrapolarán los datos del ensayo de ratones, teniendo en cuenta que el peso de los perros es mucho mayor. Además, por motivos éticos, no se utilizarán perros sanos como control y directamente se aplicará el tratamiento en los perros enfermos. Por la misma razón, se realizarán sólo dos ensayos, el primero de ellos en perros de 10 semanas, que equivale aproximadamente a 1 año en humanos, exclusivamente vía intranasal; y; directamente las dos vías combinadas, en perros de 3 años que equivalen aproximadamente a 14 años en humanos.

El peso de los perros es de 9 kg aproximadamente, por lo tanto, en base a la dosis de células infundidas en ratones, a los perros se les administrarán las siguientes dosis:



**Figura 14.** Esquema del diseño experimental del ensayo preclínico en perros de 10 semanas vía intranasal con las dosis finales.



**Figura 15.** Esquema del diseño experimental del ensayo preclínico en perros de 3 años vía intranasal combinada con intravenosa con las dosis finales.

La eficacia en el caso de los perros no se estudiará mediante el ensayo de tasa de supervivencia, sino que se realizarán exclusivamente el resto de pruebas descritas anteriormente (detección de proteína C reactiva y citoquinas en sangre, medición de niveles de GAGs en orina, MRI de órganos afectados y ensayo de comportamiento) (Figuras 14 y 15).

Como se mencionó anteriormente, los perros afectados presentan lesiones en la médula espinal, tronco encefálico y degeneración neuronal cerebelosa. Poseen cantidades extremas de vacuolas intracitoplasmáticas unidas a la membrana dentro de los hepatocitos, células epiteliales tubulares renales y fibroblastos dérmicos. Estos son los síntomas que se observarán en la MRI para ver si disminuyen. Además, los perros de pie se balancean, y presentan temblor en la cabeza antes de comenzar un movimiento, por tanto, estos serán los signos que se evaluarán en el ensayo de comportamiento (AnimalLabs, 2022).



Finalmente, igual que en los ratones, se sacrificará a los sujetos, extirpando cerebro, hígado, bazo y riñones (órganos más afectados por la enfermedad) y se realizará una reacción de inmunohistoquímica usando anticuerpos anti-SGSH marcados fluorescentemente para comprobar si esta ha alcanzado los órganos diana.

## 6 Ensayo Clínico

Se realizarán dos ensayos para las diferentes vías de administración en dos grupos de edad:

- Ensayo 1: edad de 1 a 6 años, administración vía intranasal
- Ensayo 2: edad de 7 a 15 años, administración combinada intravenosa e intranasal.

En cada ensayo se incluirá inicialmente un grupo de pacientes a los que se administrará placebo, como se muestra en la Figura 16. Una vez demostrada la eficacia del tratamiento, se le administrará la correspondiente dosis de MSCs.

En cuanto a las dosis utilizadas, a falta de bibliografía sobre la extrapolación para MSCs desde perros, se calculará en función del peso. Siendo:

- $53 \times 10^8 \text{ MSCs} \times \text{kg paciente}$  para la administración intranasal
- $53 \times 10^8 \text{ MSCs} \times \text{kg paciente}$  para la administración intravenosa

### 6.1 Ensayo 1: administración intranasal

En este ensayo se evaluará el efecto de las dosis celulares administradas por vía intranasal mediante tubos de respiración, como propone Djupesland *et al.*, tras la aplicación de hialuronidasa para disminuir la barrera de mucosa nasofaríngea.

#### FASE I-II (n=5)

##### Criterios de inclusión:

1. Consentimiento informado por escrito de uno o más tutores legalmente autorizados.
2. Edad entre 1 y 6 años.
3. Hermano o pariente de pacientes conocidos con MPS IIIA con fenotipo de progresión rápida, o genotipo asociado con fenotipo de progresión rápida, o presencia de características somáticas predictivas de progresión rápida.
4. Actividad de SGSH  $\leq 10$  % del límite inferior normal medido en leucocitos, más (1) un nivel normal de actividad enzimática de al menos otra sulfatasa (para descartar

deficiencia múltiple de sulfatasa) medido en leucocitos o (2) dos mutaciones en el gen *Sgsh*.

5. Médicamente estable y capaz de adaptarse a los requisitos del protocolo, incluidos los viajes sin imponer una carga indebida al paciente/la familia del paciente, según lo determine el investigador clínico.

Criterios de exclusión:

1. El sujeto ha recibido terapia con células madre, terapia génica o terapia de reemplazo enzimático (cualquier vía de administración).
2. Sujeto actualmente inscrito en otros ensayos clínicos de intervención.
3. Contraindicaciones para las MRI.
4. El sujeto tiene antecedentes de convulsiones mal controladas.
5. Homocigotos o heterocigotos compuestos para la mutación *S298P* o cualquier otra mutación que se sepa que está asociada con un fenotipo de progresión lenta.
6. El sujeto está recibiendo actualmente medicamentos psicotrópicos u otros que, en opinión del investigador clínico, probablemente podrían confundir sustancialmente los resultados de la prueba.
7. El sujeto ha recibido cualquier medicamento en investigación (incluida la genisteína) dentro de los 30 días anteriores a la visita inicial o está programado para recibir cualquier medicamento en investigación durante el curso del estudio.
8. Infección documentada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (ARN VIH positivo y/o anticuerpos anti-p24).
9. Neoplasia maligna (excepto cáncer de piel local) o antecedentes documentados de síndrome de cáncer hereditario. Los sujetos con una neoplasia maligna previamente tratada con éxito y un seguimiento suficiente para excluir la recurrencia (según la opinión del oncólogo) pueden incluirse después de la discusión y aprobación del Monitor Médico.
10. Mielodisplasia, alteraciones citogenéticas propias del síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda, u otros trastornos hematológicos graves.
11. El sujeto tiene una condición médica o circunstancia atenuante que, en opinión del investigador clínico, podría comprometer la capacidad del sujeto para cumplir con los requisitos del protocolo, el bienestar o la seguridad del sujeto, o la interpretabilidad de los datos clínicos del sujeto.
12. Alteraciones graves del comportamiento debido a motivos distintos a MPS IIIA y que probablemente interfieran con el cumplimiento del protocolo, según lo determine el investigador clínico.

13. La recepción de vacunas vivas dentro de los 30 días anteriores al inicio del estudio.
14. Sensibilidad conocida a hialuronidasa.

## **Evaluación:**

### Resultados primarios:

- Evaluación de la tolerancia al tratamiento: Se determinarán y graduarán los efectos adversos según la Escala de Toxicidad Clínica Pediátrica del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NAIAID) de Estados Unidos, durante un periodo de tiempo de tres años.
- Evaluación de la eficacia del tratamiento: reducción de la inflamación de hígado, bazo y cerebro medido por MRI a las dos semanas del tratamiento y luego cada mes, en comparación con las imágenes obtenidas un mes antes del tratamiento.

### Resultados secundarios:

- Evolución del comportamiento adaptativo: medido en múltiples visitas utilizando la Escala de Comportamiento Adaptativo de Vineland y su comparación con los datos de la historia natural para MPS IIIA. Evaluación un mes antes y cada mes tras el tratamiento.
- Evolución de la función cognitiva: Medición de la puntuación cognitiva (puntuaciones estándar, puntuaciones equivalentes a la edad y cociente de desarrollo) en múltiples visitas utilizando las Escalas de Desarrollo Infantil de Bayley, 3.<sup>a</sup> edición [BSID-III] o la batería de evaluación de Kaufman para niños, 2.<sup>a</sup> edición [KABC-II] frente a la historia natural de MPS IIIA. Evaluación un mes antes y cada mes tras el tratamiento.
- Cambio en el comportamiento del paciente: medido utilizando la Escala de Comportamiento de Sanfilippo frente a la historia natural de MPS IIIA. Evaluación un mes antes y cada mes tras el tratamiento.
- Evolución de la calidad de vida del paciente: medido utilizando el Cuestionario de Calidad de Vida para Bebés y Niños Pequeños contra la historia natural de MPS IIIA. Evaluación un mes antes y cada mes tras el tratamiento.
- Cambio en la vida diaria del paciente: medido utilizando el Cuestionario de sueño Infantil frente a los datos de historia natural de MPS IIIA. Evaluación 1 mes antes y cada mes tras el tratamiento.
- Concentración de heparán sulfato y GAG en plasma, orina y líquido cerebro-espinal. Evaluación 1 mes antes del tratamiento y posteriormente a los 7 días y cada mes.

- Cambio en los volúmenes totales de materia gris cortical y materia blanca: medido mediante MRI y comparando con el estado inicial previo al tratamiento. Evaluación a las 2 semanas del tratamiento y luego cada mes, y comparación con las imágenes obtenidas 1 mes antes del tratamiento.

Otras medidas:

- Explorar la presencia de anticuerpos anti-SGSH debido a una respuesta inmune frente a la enzima funcional  
(<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03612869?term=brain&cond=Sanfilippo+A&draw=2&rank=1>).
- Supervivencia general tras la administración del tratamiento, en comparación con los datos históricos  
(<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04201405?term=HSCs&cond=Sanfilippo+A&draw=2&rank=1>).

### **FASE III (n=20)**

Esta fase transcurrirá del mismo modo que la fase I-II con una muestra poblacional mayor, multinacional y multicéntrico que proporcionará un estudio más amplio de la eficacia y seguridad del tratamiento.

## **6.2 Ensayo 2: administración combinada intranasal-intravenosa.**

En este ensayo se evaluará el efecto de las dosis celular combinada administrada por la vía intranasal e intravenosa.

### **FASE I-II (n=5)**

#### Criterios de inclusión:

1. Consentimiento informado por escrito de uno o más tutores legalmente autorizados.
2. Edad entre 7 y 14 años.
3. Hermano o pariente de pacientes conocidos con MPS IIIA con fenotipo de progresión rápida, o genotipo asociado con fenotipo de progresión rápida, o presencia de características somáticas predictivas de progresión rápida.

4. Actividad de *SGSH*  $\leq 10$  % del límite inferior normal medido en leucocitos, más (1) un nivel normal de actividad enzimática de al menos otra sulfatasa (para descartar deficiencia múltiple de sulfatasa) medido en leucocitos o (2) dos mutaciones en el gen *Sgsh*.
5. Médicamente estable y capaz de adaptarse a los requisitos del protocolo, incluidos los viajes sin imponer una carga indebida al paciente/la familia del paciente, según lo determine el investigador clínico.

#### Criterios de exclusión:

1. El sujeto ha recibido terapia con células madre, terapia génica o terapia de reemplazo enzimático (cualquier vía de administración)
2. Sujeto actualmente inscrito en otros ensayos clínicos de intervención.
3. Contraindicaciones para las MRI.
4. El sujeto tiene antecedentes de convulsiones mal controladas.
5. Homocigotos o heterocigotos compuestos para la mutación *S298P* o cualquier otra mutación que se sepa que está asociada con un fenotipo de progresión lenta.
6. El sujeto está recibiendo actualmente medicamentos psicotrópicos u otros que, en opinión del investigador clínico, probablemente podrían confundir sustancialmente los resultados de la prueba.
7. El sujeto ha recibido cualquier medicamento en investigación (incluida la genisteína) dentro de los 30 días anteriores a la visita inicial o está programado para recibir cualquier medicamento en investigación durante el curso del estudio.
8. Infección documentada por el VIH (ARN VIH positivo y/o anticuerpos anti-p24).
9. Neoplasia maligna (excepto cáncer de piel local) o antecedentes documentados de síndrome de cáncer hereditario. Los sujetos con una neoplasia maligna previamente tratada con éxito y un seguimiento suficiente para excluir la recurrencia (según la opinión del oncólogo) pueden incluirse después de la discusión y aprobación del Monitor Médico.
10. Mielodisplasia, alteraciones citogenéticas propias del síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda, u otros trastornos hematológicos graves.
11. El sujeto tiene una condición médica o circunstancia atenuante que, en opinión del investigador clínico, podría comprometer la capacidad del sujeto para cumplir con los requisitos del protocolo, el bienestar o la seguridad del sujeto, o la interpretabilidad de los datos clínicos del sujeto.
12. Alteraciones graves del comportamiento debido a motivos distintos a MPS IIIA y que probablemente interfieran con el cumplimiento del protocolo, según lo determine el investigador clínico.

13. La recepción de vacunas vivas dentro de los 30 días anteriores al inicio del estudio.
14. Sensibilidad conocida a hialuronidasa.

## **Evaluación**

### Resultados primarios:

- Evaluación de la tolerancia al tratamiento: Se determinarán y graduarán los efectos adversos según la Escala de Toxicidad Clínica Pediátrica del NIAID de Estados Unidos, durante un periodo de tiempo de tres años.
- Evaluación de la eficacia del tratamiento: reducción de la inflamación de hígado, bazo y cerebro medido por MRI a las dos semanas del tratamiento y luego cada mes, en comparación con las imágenes obtenidas un mes antes del tratamiento.

### Resultados secundarios:

- Evolución del comportamiento adaptativo: medido en múltiples visitas utilizando la Escala de Comportamiento Adaptativo de Vineland y su comparación con los datos de la historia natural para MPS IIIA. Evaluación un mes antes y cada mes tras el tratamiento.
- Evolución de la función cognitiva: Medición de la puntuación cognitiva (puntuaciones estándar, puntuaciones equivalentes a la edad y cociente de desarrollo) en múltiples visitas utilizando las Escalas de Desarrollo Infantil de Bayley, 3.<sup>a</sup> edición [BSID-III] o la batería de evaluación de Kaufman para niños, 2.<sup>a</sup> edición [KABC-II] frente a la historia natural de MPS IIIA. Evaluación un mes antes y cada mes tras el tratamiento.
- Cambio en el comportamiento del paciente: Medido utilizando la Escala de Comportamiento de Sanfilippo frente a la historia natural de MPS IIIA. Evaluación un mes antes y cada mes tras el tratamiento.
- Evolución de la calidad de vida del paciente: medido utilizando el Cuestionario de Calidad de Vida para Bebés y Niños Pequeños contra la historia natural de MPS IIIA.
- Cambio en la vida diaria del paciente: medido utilizando el Cuestionario de sueño Infantil frente a los datos de historia natural de MPS IIIA. Evaluación un mes antes y cada mes tras el tratamiento.
- Concentración de heparán sulfato y GAG en plasma, orina y líquido cerebro-espinal. Evaluación un mes antes del tratamiento y posteriormente a los siete días y cada mes.
- Cambio en los volúmenes totales de materia gris cortical y materia blanca: medido mediante MRI y comparando con el estado inicial previo al tratamiento. Evaluación a

las dos semanas del tratamiento y luego cada mes, y comparación con las imágenes obtenidas un mes antes del tratamiento.

Otros resultados:

- Explorar la presencia de anticuerpos anti-SGSH debido a una respuesta inmune frente a la enzima funcional.
- Supervivencia general tras la administración del tratamiento, en comparación con el historial de supervivencia de la enfermedad.

### FASE III (n=20)

Esta fase transcurrirá del mismo modo que la fase I-II, manteniendo los mismos criterios de inclusión y exclusión, en una muestra poblacional mayor, multinacional y multicéntrico que proporcionará un estudio más amplio de la eficacia y seguridad del tratamiento.

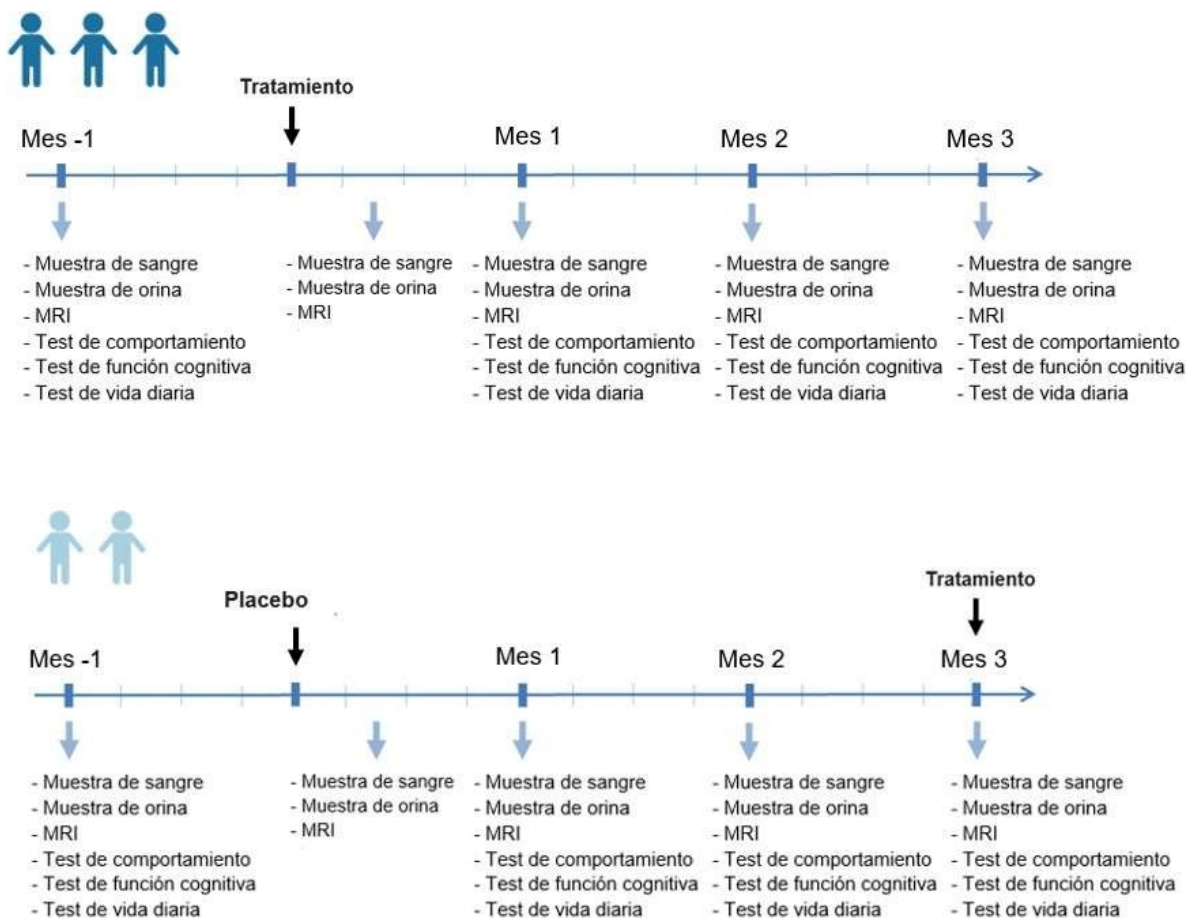


Figura 16. Esquema del diseño del ensayo clínico.

## 7 Discusión

El Síndrome de Sanfilippo es una enfermedad rara causada por una deficiencia para la que actualmente hay tratamientos paliativos, pero no hay cura. En consecuencia, se han desarrollado distintas estrategias para tratar de corregir la función enzimática. La primera en terapia propuesta fue la ERT, basada en la incorporación y corrección cruzada de la enzima funcional (Frantantoni *et al.*, 1969), y sobre la que se han desarrollado estrategias posteriores, como el trasplante de HSCs o la terapia génica. Todas estas terapias tienen una eficacia parcial a nivel sistémico, no pudiendo a travesar la barrera hematoencefálica para tratar la enfermedad a nivel del SNC, donde produce los principales síntomas. Por esto, en el caso de la terapia génica, se han investigado varias vías de administración más directas e invasivas, de las que tampoco se han obtenido resultados clínicamente relevantes. Además, este el tratamiento es temporal, por lo que requiere de múltiples dosis. Este es otro factor limitante en estas terapias, puesto que la utilización de vectores virales, enzimas recombinantes y HSCs alogénicas genera una respuesta inmune en el paciente, lo que reduce la eficacia de dosis posteriores (Wolf *et al.*, 2015).

Por otro lado, la SRT es una terapia basada en la reducción de la síntesis del contenido lisosomal mediante la utilización de un inhibidor enzimático. No obstante, este compuesto inhibidor de la síntesis de GAG debe tratarse de un inhibidor parcial y escogerse cuidadosamente para no afectar a otras rutas metabólicas, por lo que tampoco es capaz de reducir significativamente los niveles de acumulación y debe combinarse con otras terapias para mostrar resultados clínicamente significativos (Piotrowska *et al.*, 2006) (Friso *et al.*, 2010).

En resumen, el mayor inconveniente de las terapias investigadas hasta el momento es que no producen una mejoría neurológica clínicamente significativa y dependiente de la gravedad y la edad del paciente, y su eficacia tras múltiples dosis es reducida.

En este contexto, se plantea una terapia alternativa que no solo sea capaz de evitar los signos y síntomas en los niños más pequeños, sino que en los más mayores y por tanto, con un daño tisular más grave, sea capaz de revertir el efecto. Para ello, se propone el uso de MSCs modificadas genéticamente para que sobreexpresan la enzima deficiente en estos pacientes. Esta terapia se apoya en un conocido efecto de estas células: el tropismo y afinidad hacia tejidos que se encuentran dañados, especialmente en situaciones de inflamación y apoptosis, incluyendo tejido nervioso por su facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Sensebé *et al.*, 2013).

Sin embargo, la capacidad curativa de las MSCs no se centra exclusivamente en esta



sobreexpresión, sino que, a diferencia de otros linajes celulares, son capaces de inmunomodular a distintos niveles. En el sistema innato se observa una reducción generalizada de la respuesta (Zachar *et al.*, 2016)(Regmi *et al.*, 2019) y en el adaptativo, una polarización celular hacia un estado antiinflamatorio (Bernardo *and* Fibbe, 2013), que puede postergarse durante un tiempo mucho mayor a la supervivencia de las MSCs asociado a la fagocitosis por parte de macrófagos, capaces de adquirir como propias estas características inmunomoduladoras y aplicarlas (Owens *and* Lankins, 2018) . A este efecto descrito, se suma un efecto innato sobre el SNC dañado y es que la llegada y asentamiento de las MSCs en el tejido dañado, supone un soporte tanto estructural como funcional, con liberación de factores neurotróficos y de crecimiento, mejorando no solo la plasticidad sináptica, sino, además, la comunicación neuronal y con células gliales (Wei *et al.*, 2009)(Blesch, 2006).

La generación de MSCs con sobreexpresión de SGSH se realizará mediante vectores AAVs, traduciéndose en una mayor seguridad y eficacia con respecto a otros vectores. Por un lado, los vectores virales presentan una mayor eficacia con respecto a otros métodos de transfección, razón por la que se emplean de forma extensa en clínica. Además, los vectores AAVs son naturalmente deficientes en replicación, que unido a su ausencia de integración inducida para obtener el vector recombinante y a la reducida inmunogenicidad de los mismos los convierten en excelentes métodos de vehiculización (Stender *et al.*, 2007).

Diversas investigaciones han demostrado la estabilidad del transgén, así como la alta eficiencia de transducción (Wang *et al.*, 2013). Todo ello se ve mejorado por la generación de cápsidas quiméricas. Esto ha tenido como consecuencia la mejora de la infección a diversos tejidos (Zubkova *et al.*, 2021), siendo un aspecto muy positivo de la terapia al ir dirigida a una gran variedad de los mismos.

Las MSCs administradas de manera intravenosa, han demostrado atravesar la barrera hematoencefálica, alcanzando así el SNC. Sin embargo, requiere la administración de una mayor dosis debido a que el número de células que alcanzan el cerebro son minoría. Además, las MSC no perduran indefinidamente en el organismo, por lo que se requieren dosis repetitivas. Por ello, la vía intranasal es una alternativa menos invasiva y que permite que un mayor número de células alcancen eficazmente el SNC. No obstante, pacientes en un estadio más avanzado de la enfermedad, poseen un daño significativo en órganos periféricos, por lo que la administración intranasal no es suficiente. En estos casos, una combinación de ambas vías resulta ser una solución prometedora.

## 8 Conclusiones

El objetivo principal de este proyecto es diseñar un nuevo y eficaz tratamiento para el Síndrome Sanfilippo tipo A dirigido específicamente al tejido nervioso. En base a lo descrito anteriormente, se concluye que el presente tratamiento propuesto es novedoso y posee múltiples ventajas con respecto a los tratamientos actuales:

- Las MSCs poseen numerosas características ventajosas frente a otro tipo de células madre, como sus capacidades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, de soporte neuronal y su biocompatibilidad alogénica, lo que hace de estas una potencial estrategia terapéutica. Además, está ampliamente demostrada su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.
- La modificación genética de las MSCs mediante vectores AAVs es muy segura en comparación con otros vectores virales debido a la permanencia en el interior celular de forma episomal y su menor inmunogenicidad. Por otro lado, en anteriores investigaciones se ha demostrado que la expresión del transgén en MSCs transducidas con AAVs es estable y eficiente.
- La administración de las células terapéuticas a través de la vía intranasal permite alcanzar el SNC de una forma eficaz, a la vez que poco invasiva.
- Esta estrategia terapéutica permite alcanzar un mayor número de tejidos al combinar la administración vía intranasal e intravenosa en pacientes de más de 7 años que además poseen un deterioro en órganos periféricos.
- El diseño de los ensayos *in vitro* y preclínicos permiten determinar, evaluar y justificar el modo de acción, efectividad y toxicidad de esta terapia.
- El diseño de los ensayos clínicos permite evaluar su eficacia, efectos adversos y seguridad en pacientes con el Síndrome de Sanfilippo.

## 9 Bibliografía

- Al-kharboosh, R., ReFaey, K., Lara-Velazquez, M., Grewal, S. S., Imitola, J., & Quiñones-Hinojosa, A. (2020). Inflammatory Mediators in Glioma Microenvironment Play a Dual Role in Gliomagenesis and Mesenchymal Stem Cell Homing: Implication for Cellular Therapy. *Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes*, 4(4), 443–459. <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2020.04.006>
- Aronovich, E. L., Carmichael, K. P., Morizono, H., Koutlas, I. G., Deanching, M., Hoganson, G., Fischer, A., & Whitley, C. B. (2000). Canine heparan sulfate sulfamidase and the molecular pathology underlying Sanfilippo syndrome type A in Dachshunds. *Genomics*, 68(1), 80–84. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6275>
- Ashiba, H., Oyamada, C., Hosokawa, K., Ueno, K., & Fujimaki, M. (2020). Sensitive detection of c-reactive protein by one-step method based on a waveguide-mode sensor. *Sensors (Switzerland)*, 20(11). <https://doi.org/10.3390/s20113195>
- Baek, S., Oh, J., Song, J., Choi, H., Yoo, J., Park, G. Y., Han, J., Chang, Y., Park, H., Kim, H., Cho, S. G., Kim, B. S., & Kim, J. (2017). Generation of Integration-Free Induced Neurons Using Graphene Oxide-Polyethylenimine. *Small*, 13(5), 1–10. <https://doi.org/10.1002/smll.201601993>
- Barton, N. W., Furbish, F. S., Murray, G. J., Garfield, M., & Brady, R. O. (1990). Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(5), 1913–1916. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1913>
- Baxter, M. A., Wynn, R. F., Deakin, J. A., Bellantuono, I., Edington, K. G., Cooper, A., Besley, G. T. N., Church, H. J., Ed Wraith, J., Carr, T. F., & Fairbairn, L. J. (2002). Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I. *Blood*, 99(5), 1857–1859. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.5.1857>
- Benetó, N., Vilageliu, L., Grinberg, D., & Canals, I. (2020). Sanfilippo syndrome: Molecular basis, disease models and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21217819>
- Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>
- Bhaumik, M., Muller, V. J., Rozaklis, T., Johnson, L., Dobrenis, K., Bhattacharyya, R., Wurzelmann, S., Finamore, P., Hopwood, J. J., Walkley, S. U., & Stanley, P. (1999). A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome). *Glycobiology*, 9(12), 1389–1396. <https://doi.org/10.1093/glycob/9.12.1389>
- Blesch, A. (n.d.). *Neurotrophic factors in neurodegeneration*.
- Bosch, A., Perret, E., Desmaris, N., & Heard, J. M. (2000). Long-Term and Significant Correction of Brain Lesions in Adult Mucopolysaccharidosis Type VII Mice Using Recombinant AAV Vectors. *Molecular Therapy*, 1(1), 63–70. <https://doi.org/10.1006/mthe.1999.0005>

- Bougioukli, S., Chateau, M., Morales, H., Vakhshori, V., Sugiyama, O., Oakes, D., Longjohn, D., Cannon, P., & Lieberman, J. R. (2021). Limited potential of AAV-mediated gene therapy in transducing human mesenchymal stem cells for bone repair applications. *Gene Therapy*, 28(12), 729–739. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-0182-4>
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. *Cytotherapy*, 15(6), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
- Bracaglia. (2017). Gene therapy for neurologic manifestations of mucopolysaccharidoses. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.966682>.Gene
- Branska, S., Piotrowska, E. (2006). *Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses.*
- Chung, S., Ma, X., Liu, Y., Lee, D., Tittiger, M., & Ponder, K. P. (2007). Effect of neonatal administration of a retroviral vector expressing  $\alpha$ -l-iduronidase upon lysosomal storage in brain and other organs in mucopolysaccharidosis I mice. *Molecular Genetics and Metabolism*, 90(2), 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.08.001>
- Costa, C. P., Moreira, J. N., Sousa Lobo, J. M., & Silva, A. C. (2021). Intranasal delivery of nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and nanoemulsions: A current overview of in vivo studies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(4), 925–940. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.012>
- Cotten, C. M., Murtha, A. P., Goldberg, R. N., Grotegut, C. A., Smith, P. B., Goldstein, R. F., Fisher, K. A., Gustafson, K. E., Waters-Pick, B., Swamy, G. K., Rattray, B., Tan, S., & Kurtzberg, J. (2014). Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of Pediatrics*, 164(5), 973-979.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.11.036>
- Coutinho, M.F.; Prata, M.J.; Alves, S. Mannose-6-phosphate pathway: A review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol. Genet. Metab.* 2012, 105, 542–550.
- Coutinho, M. F., Santos, J. I., & Alves, S. (2016). Less Is More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *International journal of molecular sciences*, 17(7), 1065. <https://doi.org/10.3390/ijms17071065>
- Dabrowska, S., Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Neuroinflammation as a target for treatment of stroke using mesenchymal stem cells and extracellular vesicles. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1571-8>
- Desnick, R.J., Schuchman, E. H. (n.d.). *Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges.*
- Djupesland, G. (n.d.). *Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective- a review.*

- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Douglas Fields, R. and Burnstock, G. (2006). *Purinergic signalling in neuron-glia interactions*.
- Dretchen, K. L., Mesa, Z., Robben, M., Slade, D., Hill, S., Crutch, C., Kappeler, K., & Mesa, M. (2020). Intranasal epinephrine in dogs: Pharmacokinetic and heart rate effects. *Pharmacology Research and Perspectives*, 8(2), 1–9. <https://doi.org/10.1002/prp2.587>
- Eggenhofer, E., Luk, F., Dahlke, M. H., & Hoogduijn, M. J. (2014). The life and fate of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology*, 5(MAY), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00148>
- Fedele, A. O. (2015). Sanfilippo syndrome: Causes, consequences, and treatments. *Application of Clinical Genetics*, 8, 269–281. <https://doi.org/10.2147/TACG.S57672>
- Fields R. D. and Burnstock, G., "Purinergic signalling in neuron-glia interactions," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 7, no. 6, pp. 423–436, 2006
- Fraldi, A., Hemsley, K., Crawley, A., Lombardi, A., Lau, A., Sutherland, L., Auricchio, A., Ballabio, A., & Hopwood, J. J. (2007). Functional correction of CNS lesions in an MPS-III A mouse model by intracerebral AAV-mediated delivery of sulfamidase and SUMF1 genes. *Human Molecular Genetics*, 16(22), 2693–2702. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm223>
- Fratantoni, B. Y. J. C., Hall, C. W., & Neufeld, E. F. (1969). *in Mucopolysaccharide Degradation*. 360–366.
- Fu, H., DiRosario, J., Kang, L., Muenzer, J. and McCarty, D. M. (2010). *Restoration of central nervous system alpha-N-acetylglucosaminidase activity and therapeutic benefits in mucopolysaccharidosis IIIB mice by a single intracisternal recombinant adeno-associated viral type 2 vector delivery*.
- Gangaraju, R. (2018). *Concentrated conditioned media from adipose tissue derived mesenchymal stem cells mitigates visual deficits and retinal inflammation following mild traumatic brain injury*.
- García-Muñoz, E., & Vives, J. (2021). Towards the standardization of methods of tissue processing for the isolation of mesenchymal stromal cells for clinical use. *Cytotechnology*, 73(3), 513–522. <https://doi.org/10.1007/s10616-021-00474-3>
- Han, F., Liu, Y., Huang, J., Zhang, X., & Wei, C. (2021). Current Approaches and Molecular Mechanisms for Directly Reprogramming Fibroblasts Into Neurons and Dopamine Neurons. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.738529>
- Hartung, S. D., Frandsen, J. L., Pan, D., Koniar, B. L., Graupman, P., Gunther, R., Low, W. C., Whitley, C. B., & McIvor, R. S. (2004). Correction of metabolic, craniofacial, and neurologic abnormalities in MPS I mice treated at birth with adeno-associated virus vector transducing the human  $\alpha$ -L-iduronidase gene. *Molecular Therapy*, 9(6), 866–875. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.03.011>

- Holley, R., L.-S. (1986). Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Investigación y Ciencia (Scientific American)*, AGOSTO(119), 38.
- Jha, K., Pentecost, M., Lenin R., et al., "Concentrated conditioned media from adipose tissue derived mesenchymal stem cells mitigates visual deficits and retinal inflammation following mild traumatic brain injury," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 7, p. 2016, 2018.
- Jiang, Y., Zhu, J., Xu, G., & Liu, X. (2011). Intranasal delivery of stem cells to the brain. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(5), 623–632. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.566267>
- Kobayashi, H. (2019). Recent trends in mucopolysaccharidosis research. *Journal of Human Genetics*, 64(2). <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0534-8>
- Kopernio, R. (1986). Direct gene transfer to the CNS prevents emergence of neurologic disease in a murine model of mucopolysaccharidosis type I. *Investigación y Ciencia (Scientific American)*, AGOSTO(119), 38.
- Krivit, W., & Marrow, B. (1995). *Nervous system following bone marrow transplantation for lysosomal and peroxisomal storage diseases*. 4(95), 385–392.
- Langford-Smith A, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, et al. Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol Therapy*. 2012; 20(8):1610–1621.
- Li, D. Y., Li, R. F., Sun, D. X., Pu, D. D., & Zhang, Y. H. (2021). Mesenchymal stem cell therapy in pulmonary fibrosis: a meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02496-2>
- Li, J. P., & Kusche-Gullberg, M. (2016). Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 325, 215–273. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.02.009>
- Li, X. (2016). Intravenous administration of allogeneic Wharton jelly–derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with congestive heart failure secondary to myxomatous mitral valve disease. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.2460/ajvr.82.6.487>.Intravenous
- Lopez-Santalla, M., Mancheño-Corvo, P., Escolano, A., Menta, R., DelaRosa, O., Abad, J. L., Büscher, D., Redondo, J. M., Bueren, J. A., Dalemans, W., Lombardo, E., & Garin, M. I. (2017). Biodistribution and efficacy of human adipose-derived mesenchymal stem cells following intranodal administration in experimental colitis. *Frontiers in Immunology*, 8(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00638>
- Lu, M. H., Ji, W. L., Chen, H., Sun, Y. Y., Zhao, X. Y., Wang, F., Shi, Y., Hu, Y. N., Liu, B. X., Wu, J. W., Xu, D. E., Zheng, J. W., Liu, C. F., & Ma, Q. H. (2021). Intranasal Transplantation of Human Neural Stem Cells Ameliorates Alzheimer's Disease-Like Pathology in a Mouse Model. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13(March), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.650103>
- Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., A. Curat, A., Busse, R., and Bouloumié, A., "Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem

- cells," *Circulation*, vol. 110, no. 3, pp. 349–355, 2004
- Müller, I., Kustermann-Kuhn, B., Holzwarth, C., Isensee, G., Vaegler, M., Harzer, K., Krägeloh-Mann, I., Handgretinger, R., & Bruchelt, G. (2006). In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients. *Experimental Hematology*, 34(10), 1413–1419. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.06.007>
- Munir, H., Ward, L. S. C., & McGettrick, H. M. (2018). Mesenchymal stem cells as endogenous regulators of inflammation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1060, 73–98. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78127-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78127-3_5)
- National, G., & Pillars, H. (n.d.). *Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells*.
- Neves, A. F., Camargo, C., Premer, C., Hare, J. M., Baumel, B. S., & Pinto, M. (2021). Intravenous administration of mesenchymal stem cells reduces Tau phosphorylation and inflammation in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 341, 113706. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113706>
- Nitahara-Kasahara, Y., Kuraoka, M., Oda, Y., Hayashita-Kinoh, H., Takeda, S., & Okada, T. (2021). Enhanced cell survival and therapeutic benefits of IL-10-expressing multipotent mesenchymal stromal cells for muscular dystrophy. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02168-1>
- Ozawa, K., Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., Mizukami, H., & Kume, A. (2008). Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *Journal of Autoimmunity*, 30(3), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.12.008>
- Platt, F.M., Jeyakumar, M., Andersson, U., Heare, T., Dwek, R., Butters, T. B. (2003). *Substrate reuction therapy in mouse models of the glycosphingolipidoses*.
- Platt, F. M., d'Azzo, A., Davidson, B. L., Neufeld, E. F., & Tiffit, C. J. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>
- Prasad, V., Mendizabal, A. and Parikh, S. (2008). *Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes*.
- Radin, N. S. (1996). *Treatment of Gaucher disease with an enzyme inhibitor*.
- Regmi, S., Pathak, S., Kim, J. O., Yong, C. S., & Jeong, J. H. (2019). Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. *European Journal of Cell Biology*, 98(5–8), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2019.04.002>
- Sanchez-Diaz, M., Quiñones-Vico, M. I., de la Torre, R. S., Montero-Vílchez, T., Sierra-Sánchez, A., Molina-Leyva, A., & Arias-Santiago, S. (2021). Biodistribution of mesenchymal stromal cells after administration in animal models and humans: A systematic review. *Journal of Clinical Medicine*, 10(13). <https://doi.org/10.3390/jcm10132925>

- Scarpa, M., Salvalaio, M., Tmanin, R., Friso, A. (2010). *Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II*.
- Sensebé, L., & Fleury-Cappellesso, S. (2013). Biodistribution of mesenchymal stem/stromal cells in a preclinical setting. *Stem Cells International*, 2013(1394). <https://doi.org/10.1155/2013/678063>
- Serdar, C. C., Cihan, M., Yücel, D., & Serdar, M. A. (2021). Sample size, power and effect size revisited: Simplified and practical approach in pre-clinical, clinical and laboratory studies. *Biochemia Medica*, 31(1), 1–27. <https://doi.org/10.11613/BM.2021.010502>
- Sergijenko, A., Langford-Smith, A., Liao, A. Y., Pickford, C. E., McDermott, J., Nowinski, G., Langford-Smith, K. J., Merry, C. L., Jones, S. A., Wraith, J. E., Wynn, R. F., Wilkinson, F. L., & Bigger, B. W. (2013). Myeloid/Microglial driven autologous hematopoietic stem cell gene therapy corrects a neuronopathic lysosomal disease. *Molecular Therapy*, 21(10), 1938–1949. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.141>
- Sorrentino, N. C. (2016). *Brain Targeting in MPS-III A Therapy for Lysosomal Storage Disorders : How Therapies are being Developed for Orphan Diseases PART THREE : Significant new approaches and. June*.
- Souillet, G., Guffon, N., Maire, I., Pujol, M., Taylor, P., Sevin, F., Bleyzac, N., Mulier, C., Durin, A., Kebaili, K., Galambrun, C., Bertrand, Y., Froissart, R., Dorche, C., Gebuhrer, L., Garin, C., Berard, J and Guibaud, P. (2003). *Outcome of 27 patients with Hurler's syndrome transplanted from either related or unrelated haematopoietic stem cell sources*.
- Spriet, M., Hunt, G. B., Walker, N. J., & Borjesson, D. L. (2015). Scintigraphic tracking of mesenchymal stem cells after portal, systemic intravenous and splenic administration in healthy beagle dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 56(3), 327–334. <https://doi.org/10.1111/vru.12243>
- Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>
- Stender, S., Murphy, M., O'Brien, T., Stengaard, C., Ulrich-Vinther, M., Søballe, K., & Barry, F. (2007). Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *European Cells and Materials*, 13, 93–99. <https://doi.org/10.22203/eCM.v013a10>
- Suarez-Guerrero, J. L., Gómez Higuera, P. J. I., Arias Flórez, J. S., & Contreras-García, G. A. (2016). Mucopolisacaridosis: características clínicas, diagnóstico y de manejo. *Revista Chilena de Pediatría*, 87(4), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.10.004>
- Tappenbeck, N., Schröder, H. M., Niebergall-Roth, E., Hassinger, F., Dehio, U., Dieter, K., Kraft, K., Kerstan, A., Esterlechner, J., Frank, N. Y., Scharffetter-Kochanek, K., Murphy, G. F., Orgill, D. P., Beck, J., Frank, M. H., Ganss, C., & Kluth, M. A. (2019). In vivo safety profile and biodistribution of GMP-manufactured human skin-derived ABCB5-positive mesenchymal stromal cells for use in clinical trials. *Cytotherapy*, 21(5), 546–560. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.12.005>
- Tardieu, M., Zérah, M., Husson, B., De Bournonville, S., Deiva, K., Adamsbaum, C., Vincent, F., Hocquemiller, M., Broissand, C., Furlan, V., Ballabio, A., Fraldi, A., Crystal, R. G., Baugnon, T., Roujeau, T., Heard, J. M., & Danos, O. (2014). Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs



- in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: Results of a phase I/II trial. *Human Gene Therapy*, 25(6), 506–516. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.238>
- Taylor, S. C., & Posch, A. (2014). The design of a quantitative western blot experiment. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/361590>
- Vater, C., Kasten, P., & Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, 7(2), 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.037>
- Wang, Q., Zhang, Z., Ding, T., Chen, Z., & Zhang, T. (2013). Mesenchymal stem cells overexpressing PEDF decrease the angiogenesis of gliomas. *Bioscience Reports*, 33(2), 199–205. <https://doi.org/10.1042/BSR20110124>
- Watson, G., Bastacky, J., Belichenko, P., Buddhikot, M., Jungles, S., Vellard, M., Mobley, WC and Kakkis, E. (2006). *Intrathecal administration of AAV vectors for the treatment of lysosomal storage in the brains of MPS I mice.*
- Watson, GL., Raju, NR., Aguilar, CP., Elliger CA., Elliger, S. (1999). *Elimination of lysosomal storage in brains of MPS VII mice treated by intrathecal administration of an adeno-associated virus vector.*
- Wei X., Zhao, L., Zhong, J., "Adipose stromal cells secreted neuroprotective media against neuronal apoptosis," *Neuroscience Letters*, vol. 462, no. 1, pp. 76–79, 2009
- Williams, R., & Thornton, M. J. (2020). *Isolation of different dermal fibroblast populations from the skin and the hair follicle.* 2154, 13–22. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0648-3>
- Wolf DA, Banerjee S, Hackett PB, Whitley CB, McIvor RS, Low WC. Gene Therapy for Neurologic Manifestations of Mucopolysaccharidoses. *Expert OpinDrug Delivery* (2015) 12(2):283–96. doi: 10.1517/17425247.2015.966682
- Wolfe, J.H., Sands, M.S., Barker, J.E., Gwynn, B., Rowe, L.B., Vogler, C.A., Birkenmeier, E. H. (1992). *Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer.*
- Yarygin, K. N., Namestnikova, D. D., Sukhinich, K. K., Gubskiy, I. L., Majouga, A. G., & Kholodenko, I. V. (2021). Cell therapy of stroke: Do the intra-arterially transplanted mesenchymal stem cells cross the blood–brain barrier? *Cells*, 10(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cells10112997>
- Zachar, L., Bačenková, D., & Rosocha, J. (2016). Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *Journal of Inflammation Research*, 9, 231–240. <https://doi.org/10.2147/JIR.S121994>
- Zubkova, E. S., Beloglazova, I. B., Ratner, E. I., Dyikanov, D. T., Dergilev, K. V., Menshikov, M. Y., & Parfyonova, Y. V. (2021). Transduction of rat and human adipose-tissue derived mesenchymal stromal cells by adeno-associated viral vector serotype DJ. *Biology Open*, 10(9), 1–9. <https://doi.org/10.1242/bio.058461>
- <http://www.animalabs.com/shop/dogs/mps-mucopolysaccharidosis-iiia-dachshund/>

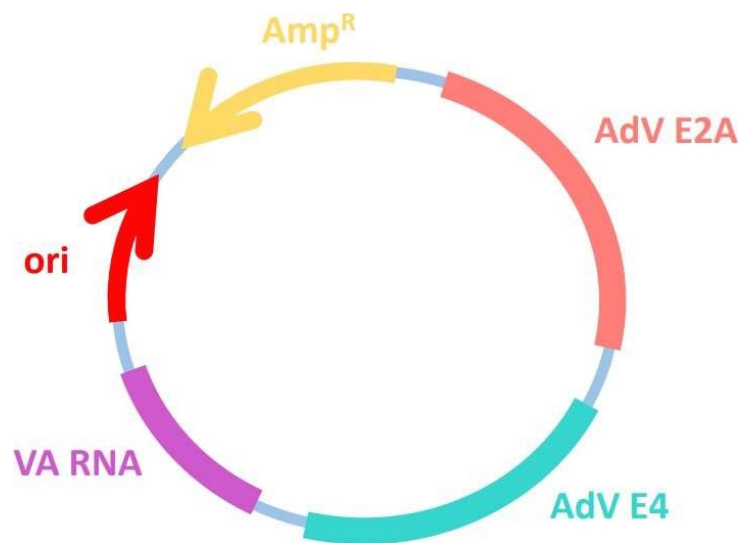
## Glosario de abreviaturas

- MPS: mucopolisacaridosis
- GAG: glicosaminoglicanos
- IDS: Iduronato-2-sulfato sulfatasa
- SGSH: sulfamidasa
- NAGLU:  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa
- HGSNAT: heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase GNS:
- GALNS: galactosamina 6-sulfato sulfatasa
- BGAL:  $\beta$ -galactosidasa
- ARBS: acetilglucosamina-4-sulfatasa
- GUSB: beta-glucuronidasa
- HD: hialuronidasa
- ERT: terapia de remplazo enzimático
- MPR: receptor de manosa-6-fosfato
- HSC: células madre hematopoyéticas
- SRT: terapia de reducción de sustrato
- AAV: virus adenoasociados
- SNC: sistema nervioso central
- MSC: células madre mesenquimales
- BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro
- GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía
- CNTF: factor neurotrófico ciliar humano
- HGF: factor de crecimiento hepático
- TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$
- VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial
- RFP: proteína roja fluorescente
- RER: retículo endoplasmático rugoso
- $\beta$ -GP:  $\beta$ -glicerofosfato
- BMP: proteínas morfogenéticas óseas
- ITR: *inverted terminal repeats*
- CMV: citomegalovirus
- PEI: polietilenimina
- MRI: resonancia magnética de imagen
- NAIAID: Escala de Toxicidad Clínica Pediátrica del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas

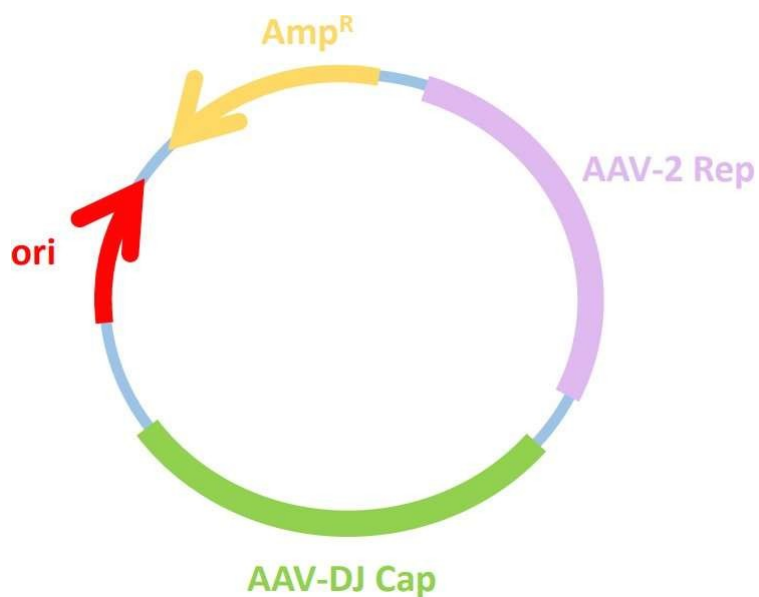
## ANEXOS

**Anexo 1.** Plásmido *Helper* de 15,4 kb constituido por los genes necesarios para el ciclo viral VA RNA, E2A y E4. Además, incluye un promotor (no descrito en la imagen), un origen de replicación (*ori*) y un marcador de resistencia a ampicilina ( $Amp^R$ ) (A). Plásmido AAV-DJ de 7,3 kb que incluye el gen *Rep* procedente del serotipo AAV-2 necesario para la replicación y empaquetamiento y el gen *Cap* quimérico codificante de las proteínas que conformarán la cápside, así como el *ori*,  $Amp^R$  y promotor (B).

A



B



## **Anexo 2. Secuencia del cDNA de SGSH, desde el primer ATG hasta el codón de STOP.**

**ATG**AGCTGCCCCGTGCCCGCCTGCTGCGCGCTGCTGCTAGTCCTGGGGCTCTGCCGGGCGCGTCCCCG  
GAACGCACTGCTGCTCCTCGCGGATGACGGAGGCTTTGAGAGTGGCGCGTACAACAACAGCGCCATCG  
CCACCCCGCACCTGGACGCCTTGGCCCCCGCAGCCTCCTCTTTCGCAATGCCTTCACCTCGGTCAGC  
AGCTGCTCTCCCAGCCGCGCCAGCCTCCTCACTGGCCTGCCCCAGCATCAGAAATGGGATGTACGGGCT  
GCACCAGGACGTGCACCACTTCAACTCCTTCGACAAGGTGCGGAGCCTGCCGCTGCTGCTCAGCCAAG  
CTGGTGTGCGCACAGGCATCATCGGGAAGAAGCACGTGGGGCCGGAGACCGTGTACCCGTTTGACTTT  
GCGTACACGGAGGAGAATGGCTCCGTCCTCCAGGTGGGGCGGAACATCACTAGAATTAAGCTGCTCGT  
CCGAAATTCTGCAGACTCAGGATGACCGGCCTTTCTTCTCTACGTGCGCTTCCACGACCCCCACC  
GCTGTGGGCACTCCCAGCCCCAGTACGGAACCTTCTGTGAGAAGTTTGGCAACGGAGAGAGCGGCATG  
GGTCGTATCCCAGACTGGACCCCCAGGCCTACGACCCACTGGACGTGCTGGTGCCTTACTTCGTCCC  
CAACACCCCGGCAGCCCGAGCCGACCTGGCCGCTCAGTACACCACCGTCGGCCGCATGGACCAAGGAG  
TTGGACTGGTGTCCAGGAGCTGCGTGACCGGTGTCCTGAACGACACACTGGTGTATCTTCACGTCC  
GACAACGGGATCCCCTTCCCCAGCGGCAGGACCAACCTGTACTGGCCGGGCACTGCTGAACCCTTACT  
GGTGTTCATCCCCGGAGCACCCAAAACGCTGGGGCCAAGTCAGCGAGGCCTACGTGAGCCTCCTAGACC  
TCACGCCCACCATCTTGGATTGGTTCTCGATCCCGTACCCAGCTACGCCATCTTTGGCTCGAAGACC  
ATCCACCTCACTGGCCGGTCCCTCCTGCCGGCGCTGGAGGCCGAGCCCCTCTGGGCCACCGTCTTTGG  
CAGCCAGAGCCACCACGAGGTACCATGTCTACCCATGCGCTCCGTGCAGCACCGGCACTTCCGCC  
TCGTGCACAACCTCAACTTCAAGATGCCCTTTCCCATCGACCAGGACTTCTACGTCTCACCCACCTTC  
CAGGACCTCCTGAACCGCACCCACAGCTGGTCAGCCACGGGCTGGTACAAGGACCTCCGTCACTACTA  
CTACCGGGCGCGCTGGGAGCTCTACGACCGGAGCCGGGACCCCCACGAGACCCAGAACCTGGCCACCG  
ACCCGCGCTTTGCTCAGCTTCTGGAGATGCTTCGGGACCAGCTGGCCAAGTGGCAGTGGGAGACCCAC  
GACCCCTGGGTGTGCGCCCCGACGGCGTCTGGAGGAGAAGCTCTCTCCCCAGTGCCAGCCCTCCA  
CAATGAGCTGTGA