

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE N-  
ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA Y REDUCCIÓN DE  
GLICOSAMINOGLICANOS SOBRE FIBROBLASTOS MSP IV Y HEK-293  
EMPLEANDO VECTORES VIRALES.**



**Angélica María Herreño Pachón**

**Trabajo de Grado**

**Carrera de Biología**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
INSTITUTO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO  
Bogotá D.C.  
2014**

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE N-  
ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA Y REDUCCIÓN DE  
GLICOSAMINOGLICANOS SOBRE FIBROBLASTOS MSP IV Y HEK-293  
EMPLEANDO VECTORES VIRALES.**

**Angélica María Herreño Pachón**

**Trabajo de Grado**

-----  
**CONCEPCION JUDITH PUERTA BULA Ph.D**

**DECANA FACULTADA DE CIENCIAS**

-----  
**ANDREA PATRICIA FORERO**

**DIRECTORA DEL PROGRAMA**

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE N-  
ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA Y REDUCCIÓN DE  
GLICOSAMINOGLICANOS SOBRE FIBROBLASTOS MSP IV Y HEK-293  
EMPLEANDO VECTORES VIRALES.**

**Angélica María Herreño Pachón**

**Trabajo de Grado**

-----  
**CARLOS JAVIER ALMÉCIGA DÍAZ Ph.D.**

**DIRECTOR**

-----  
**JHON JAIRO SUTACHAN Ph.D.**

**JURADO**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra otra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## **AGRADECIMIENTOS.**

*Le agradezco a Dios por permitirme cumplir mis sueños y metas en la universidad y en la vida.*

*Agradezco a la Pontificia Universidad Javeriana por brindarme las instalaciones y el apoyo para desarrollar mi proyecto de grado y finalizar mi pregrado.*

*A mi mamá por todo el apoyo y el esfuerzo brindado durante esta etapa de mi vida, sin ella no hubiese podido lograr este paso tan importante. A mi tía y a mi abuela por su amor y comprensión durante mi carrera universitaria. Las llevo siempre en mi corazón.*

*A Fionita por su compañía.*

*A Javier por brindarme la oportunidad de pertenecer al IEIM y por su constancia, mil gracias.*

*A todos los integrantes del IEIM especialmente al Doctor Barrera, Lu, Dennisin, Lau, Linis, Auris, Lili, Joko y el profe Alex por su apoyo, buena energía y sabiduría, muchas gracias.*

*A mis amigos de la universidad que hacen parte de mi familia, especialmente a Héctor Gómez por su ayuda, apoyo y comprensión.*

*En memoria de mi ángel guardián mi abuelito José.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL ROBLEMA</b>	<b>11</b>
<b>4. REFERENTES CONCEPTUALES</b>	<b>4</b>
<b>a. Las enfermedades de almacenamiento lisosomal</b>	<b>5</b>
<b>b. Las mucopolisacaridosis (MPS)</b>	<b>5</b>
<b>c. Las mucopolisacaridosis IVA o síndrome de Morquio A</b>	<b>5</b>
<b>d. Tratamientos actuales y alternativos.</b>	<b>6</b>
<b>e. Terapia génica- vectores lentivirales y AAV</b>	<b>7</b>
<b>5. objetivo general</b>	<b>8</b>
<b>6. Metodología</b>	
<b>a. Producción de vectores</b>	<b>8</b>
<b>b. Cultivo de células HEK-293 y Fibroblastos MPS IVA</b>	<b>9</b>
<b>c. Cultivos celular de HEK-293 y Fibroblastos MPS IVA en cajas de doce pozos</b>	<b>9</b>
<b>d. Transducción de células HEK-293 y Fibroblastos MPS IVA</b>	<b>9</b>
<b>e. Cuantificación de la aactividad de GALNS en células HEK-293, Fibroblastos MPS IVA y Fibroblastos normales.</b>	<b>10</b>
<b>f. Medición genomas virales y expresión del vector</b>	<b>11</b>
<b>g. Cuantificación de la reducción de las acumulaciones de GAG</b>	<b>12</b>
<b>h. Cuantificación de la aactividad de la actividad de hexosaminidasa</b>	<b>12</b>
<b>i. Análisis estadísticos</b>	<b>13</b>
<b>7. Resultados</b>	
<b>a. para el primer objetivo</b>	<b>14</b>
<b>b .Para el segundo objetivo</b>	<b>21</b>

**c. Para el tercer objetivo-----22**

**8. discusión-----23**

**9. conclusiones -----28**

**10. Recomendaciones -----28**

**11. Referencias-----29**

## **Anexos**

<b>1.</b>	<b>Prueba de contrastes ortogonales para HEK293-----</b>	<b>33</b>
<b>2.</b>	<b>Prueba de contrastes ortogonales para fibroblastos MPS IV A-----</b>	<b>34</b>
<b>3.</b>	<b>Prueba de contrastes ortogonales para hexosaminidasa especifica – controles MPS IV A sin tratar-----</b>	<b>36</b>
<b>4.</b>	<b>Prueba de Dunnett-----</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>Prueba de Bonferroni-----</b>	<b>39</b>



## Resumen

La mucopolisacaridosis IVA (MPS IVA) o síndrome de Morquio A pertenece al grupo de enfermedades de almacenamiento lisosomal. Esta enfermedad es causada por la deficiencia en la enzima lisosomal N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS), la cual degrada el queratán sulfato y condroitin-6-sulfato. Los pacientes con MPS IVA presentan características clínicas específicas tales como problemas respiratorios, apnea, enfermedades cardíacas, discapacidad visual, estatura baja, cuello corto, entre otros. Dentro de los posibles tratamientos para MPS IVA se encuentra la terapia génica. Avances recientes han demostrado que el uso de vectores AAV y lentivirales han generado niveles elevados de actividad GALNS. Sin embargo, para continuar con los estudios en terapia génica como un posible tratamiento para MPS IVA, se debe estudiar la correlación que existe entre la actividad de GALNS reportada después de la transducción con los efectos terapéuticos que se pueden presentar.

En este trabajo se evaluó la relación que presenta la actividad de GALNS con la expresión de los vectores AAV y lentivirales y el efecto de la actividad enzimática sobre biomarcadores primarios (glicosaminoglicano queratán sulfato) y secundarios (hexosaminidasa total). Este estudio se llevó a cabo mediante transducción de células HEK293 y fibroblastos MPS IV A humanos con vectores AAV y lentivirales. Los resultados obtenidos indican que los vectores permiten la entrega y expresión de gen GALNS. Los efectos sobre la acumulación de queratán sulfato se observan mayormente en concentraciones de 5 MOI para fibroblastos Morquio A transducidos con vectores lentivirales donde se observa una reducción notable de queratán. Para el efecto sobre la actividad de la enzima lisosomal hexosaminidasa se observa un aumento de la actividad con respecto a los controles de fibroblastos MPS IVA sin tratar, la mayor actividad se reportan con concentraciones de 1 MOI y 5 MOI.

## Introducción

La mucopolisacaridosis IV A es una enfermedad que se hereda de forma autosómica recesiva y es causada por una deficiencia en la enzima lisosomal N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS), la cual degrada el queratán sulfato (QS) y el condroitin-6-sulfato (C6S) [1]. Esta deficiencia genera la acumulación intracelular de QS y C6S en lisosomas de tejidos como córnea, hígado, corazón, ligamentos y cartílago [2][3]. Los pacientes que presentan MPS IVA poseen características clínicas como problemas respiratorios, apnea, enfermedades cardiacas, discapacidad visual, estatura baja, cuello corto, tórax en quilla y hundimiento de la caja torácica inferior, condrodisplasia esquelética, gibbus, escolosis y genu valgo, entre otros [4][3][5]. La severidad de estas características puede variar dependiendo de la mutación [5].

La enfermedad de Morquio A es una enfermedad monogénica, la cual implica la mutación en un solo gen, razón por la cual la terapia génica se plantea como posible solución para corregir el defecto genético en la MPS IVA [4][3][6]. La terapia génica se fundamenta en la entrega de una copia normal del gen mutado a un órgano o tejido diana mediante el uso de vectores [7] [8]. Estudios preclínicos en modelos animales han demostrado la eficiencia que presenta esta terapia a largo plazo en músculos esquelético y cardíaco con solo una administración *in vivo* [9]. Los vectores lentivirales y adenoasociados (AAV) usados en estudios preclínicos de enfermedades de depósito lisosomal han demostrado la alta eficiencia de estos al presentar un efecto terapéutico a largo plazo [10][11].

Estudios de terapia génica en MPS IVA han arrojado datos fundamentales para orientar los estudios pre-clínicos y clínicos. Estos estudios han demostrado la eficiencia que presentan los vectores AAV para transducir células *in vivo* y de esta manera aumentar la actividad enzimática de GALNS [6]. Otros estudios han evaluado la cotransducción del gen GALNS y el gen SUMF1 mediante vectores AAV. Los resultados demuestran que la coexpresión de estos dos genes aumenta la actividad enzimática en cultivo celular, sin embargo, la actividad puede presentar variaciones dependiendo del tipo de célula transfectada [1]. Otros estudios realizados por el Instituto de Errores Innato del Metabolismo en el año 2012 demostraron que los niveles de actividad GALNS se incrementaba con el uso de vectores lentivirales estos estudios se aplicaron a cultivo celular. Sin embargo, no se han realizados estudios que permitan evaluar el efecto terapéutico *in vivo*, ni si la expresión génica cambia por efecto de los vectores [12][13]. Por ende

este proyecto busca evaluar los efectos en biomarcadores primarios y secundarios y los cambios en la expresión génica después de la transducción de células HEK-293 y fibroblastos MPS IV con vectores AAV y lentivirales.

Los resultados obtenidos a partir de este proyecto permitirán conocer los efectos que se obtienen a partir de la transducción con vectores lentivirales y adenoasociados y si estos están relacionados directamente con la actividad de la enzima GALNS (dependiendo de la concentración de los vectores) y los efectos sobre biomarcadores primarios (GAG) y secundarios (hexosaminidasa total). Estos resultados postularían a la terapia génica con vectores adenoasociados y lentivirales como una terapia efectiva para tratar a los pacientes con MPS IVA.

### **Planteamiento del Problema**

Los errores innatos del metabolismo son desordenes genéticos causados por la deficiencia en la producción de una proteína, transportador o receptor, los cuales están implicados en el metabolismo de diferentes componentes bioquímicos (aminoácidos, lípidos, hidratos de carbono y proteínas). Esta deficiencia causa un bloqueo en una ruta metabólica que genera una acumulación o deficiencia de un metabolito afectando el funcionamiento celular. La toxicidad, la disminución de moléculas energéticas, los cambios en la estructura celular o en la señalización, entre otros, son efectos que se puede generar por la deficiencia de estos componentes bioquímicos [14].

Las mucopolisacaridososis son errores innatos del metabolismo que se presenta por la deficiencia en una enzima lisosomal causando acumulación de GAG en tejidos conectivo, epitelial y óseo [3]. La mucopolisacaridososis IVA o enfermedad de Morquio A pertenece a las mucopolisacaridososis y es causada por la deficiencia en la enzima lisosomal GALNS. La deficiencia en esta enzima genera la acumulación intracelular de queratán sulfato y condroitin-6-sulfato principalmente en córnea, hígado corazón, ligamentos y cartílago [2][3] En busca de un tratamiento para la MPS IVA se han planteado diferentes terapias. Dentro de las posibles terapias se encuentran la terapia de remplazo enzimático (TRE), la terapia con células madre hematopoyéticas (HSCT, por sus siglas en inglés) y la terapia génica [5][3]. Recientes estudios han demostrado la eficiencia de TRE en la disminución de QS y C6S en tejidos y órganos afectados como médula ósea, tejido conectivo, válvulas cardíacas, ligamentos y tejido conectivo [1]. A pesar de los resultados benéficos de TRE los pacientes requieren una administración

intravenosa semanal de la enzima recombinante con costos anuales estimados de US\$500.000 por paciente [1]. También los estudios clínicos enfocados en la terapia con células madre hematopoyéticas han mostrados que los niveles de la actividad GALNS en linfocitos de pacientes tratados aumentan, no obstante, esta terapia requiere de estudios clínicos extenso y rigurosos y de cuidados clínicos especiales debido al alto grado de infección y de mortalidad al que es susceptible [5]. Los estudios preclínicos realizados en terapia génica para Morquio A han evaluado vectores virales derivados de virus adenoasociados (AAV) y lentivirus (LV) portando el gen GALNS, y con o sin la transducción del gen de la enzima activadora de sulfatasas (SUMF1). Estos resultados evidenciaron un aumento en la actividad de GALNS [1][6][12][13], también resultados de estudios preclínicos aplicados a modelos animales han evidenciado que los niveles de la enzima permanecen durante un tiempo prologado con una sola aplicación del vector [1]. Sin embargo no se conocen los efectos en biomarcadores primarios (glicosaminoglicano queratán sulfato) y secundarios (hexosaminidasa total) que pueden llegar a presentar los incrementos en los niveles de actividad de GALNS reportados.

Con el objetivo de continuar con la evaluación de la terapia génica como alternativa de tratamiento para la enfermedad de Morquio A, es necesario evaluar los efectos que presentan los niveles de actividad GALNS obtenidos tras la transducción con vectores virales sobre la acumulación de queratán sulfato y niveles de la enzima lisosomal hexosaminidasa.

Los resultados obtenidos a partir de este proyecto permitirán caracterizar los efectos que se obtienen a partir de la transducción de fibroblastos de pacientes MPS IVA con vectores lentivirales y adenoasociados y si los efectos reportados se relacionan directamente con la actividad de la enzima GALNS y los cambios en la expresión del gen GALNS. Estos resultados postularían a la terapia génica con vectores adenoasociados y lentivirales como una terapia efectiva para tratar a los pacientes con MPS IVA.

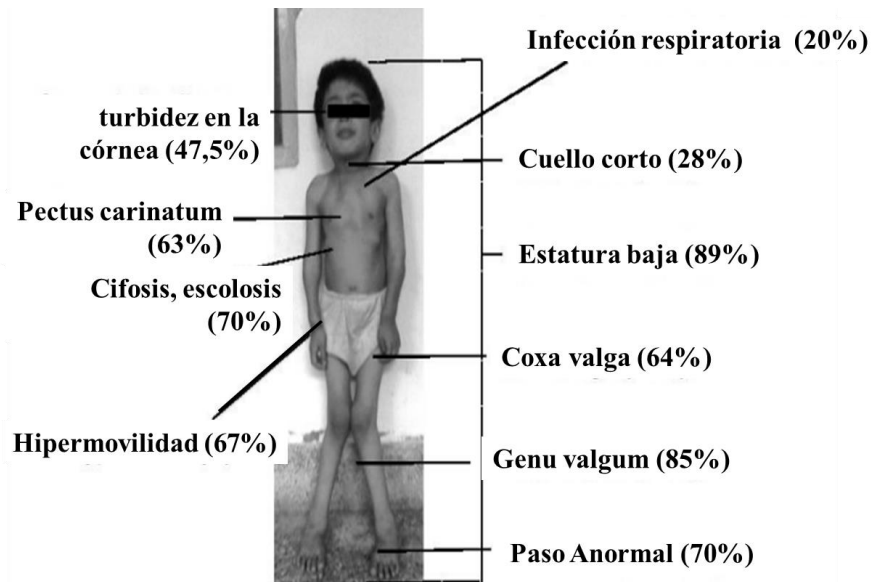
## **Referentes Conceptuales**

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal son errores innatos del metabolismo que componen un grupo de más de 50 trastornos que presentan características similares [7][15]. Estas enfermedades se pueden heredar de forma autosómica recesiva o ligadas a X y son producidas

por la deficiencia en una enzima lisosomal específica, lo que conlleva a la acumulación en este organelo de macromoléculas no degradadas, [7][15]. A pesar de que como entidades independientes son enfermedades raras, como grupo presentan una incidencia de 1 por cada 7000 nacidos vivos [7]. Los principales problemas de salud están relacionados con organomegalia, implicaciones del sistema nervioso y complicaciones con el sistema esquelético [15].

Las mucopolisacaridosis (MPS) pertenecen al grupo de enfermedades de almacenamiento lisosomal. Este grupo de enfermedades son producidas por la deficiencia en las enzimas que metabolizan progresivamente los GAG, lo que genera acumulación de GAG en lisosomas de diferentes tejidos, resultando en las complicaciones de salud características de este grupo de enfermedades [3]. Existen 10 enzimas (cuatro glicosidasas, cinco sulfatasas y una transferasa no hidrolítica), que degradan los GAG sulfato de dermatan, sulfato de heparan, sulfato de queratan, y sulfato de condroitin. Los 11 tipos de MPS se derivan a partir de la deficiencia en alguna de estas enzimas. Por esta razón las MPS presentan características similares, no obstante también presentan características propias de cada tipo de MPS, dependiendo del GAG acumulado [3].

Dentro de las mucopolisacaridosis se encuentran las mucopolisacaridosis IVA o síndrome de Morquio A. Este trastorno es ocasionado por la deficiencia en la enzima lisosomal GALNS, encargada de degradar el sulfato queratán (QS) y el condroitin-6-sulfato (C6S). Esta es una enfermedad monogénica y se hereda de forma autosómica recesiva [3] [4]. Los pacientes presentan características clínicas que incluyen problemas respiratorios, coxa valga enfermedad cardíaca valvular, discapacidad visual (turbidez en la córnea), anomalías dentales, estatura baja, cuello corto, tórax en quilla y hundimiento de la caja torácica inferior, desviación cubital de las muñecas, condrodisplasia esquelética sistémica y escoliosis (Figura 1.) [4][3][16][17]. Las características clínicas y físicas de esta enfermedad se evidencian entre el primer y el tercer año de edad [4].



**Figura 1.** Porcentajes de las principales características clínicas y físicas clásicas de la enfermedad de Morquio A [17].

Actualmente no existe una terapia efectiva para la MPS IV solo se han establecido tratamientos y cuidados paliativos para mantener la calidad de vida del paciente y mitigar las manifestaciones de la enfermedad [1]. Sin embargo, se han planteado terapias para tratar la MPS IVA tales como: la terapia de remplazo enzimático (TRE), terapia con células madre hematopoyéticas (HSCT siglas en ingles) y la terapia génica [5]. La terapia de remplazo enzimático para MPS IV se fundamenta en la producción de la enzima GALNS recombinante purificada para su posterior administración [18]. Los resultados obtenidos brindan a los estudios clínicos y preclínicos datos fundamentales en el diseño de TRE con enzimas de GALNS recombinante que permitan ser aplicadas a pacientes con la enfermedad de Morquio A [19]. Sin embargo, este tipo de tratamientos requieren de elevadas suma de dinero debido a que la administración debe realizarse semanalmente [1]. La terapia con células madre hematopoyéticas es una terapia que busca proveer continuamente la enzima GALNS a los órganos que presenta una acumulación de QS y C6S, mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas de un donante sano, no obstante los procedimientos pre y post-trasplantes que se llevan acabó en esta terapia presentan un alto riesgo de infección y morbilidad [5].

En busca de un tratamiento que pueda corregir el defecto génico en MPS IV A la terapia génica se ha planteado como un tratamiento potencialmente efectivo para corregir el defecto génico

mediante la entrega del gen normal GALNS a tejidos diana a través de vectores [6][7]. Estudios preclínicos realizados en modelos animales han demostrado la alta eficiencia de los vectores virales para transferir genes a tejidos del músculo esquelético, hígado y corazón [9] [20]. En estudios preclínicos de enfermedades lisosomales se han implementado vectores lentivirales y adenoasociados los cuales han evidenciado efectos terapéuticos sobre la actividad enzimática a largo plazo [6] [11].

Los vectores adenoasociados son viriones no patogénicos que han sido de gran interés para realizar estudios en enfermedades lisosomales debido a que estos presentan una alta capacidad de infección a células que se encuentran en división y quiescentes, presentan una expresión a largo plazo la cual se da de forma episómica y una de las características más importante es que no están asociados con enfermedades en humanos [17] [6]. Estudios *in vitro* realizados con vectores adenoasociados dirigidos por el promotor del citomegalovirus han demostrado un aumento de la actividad enzimática de GALNS en células HEK293 y fibroblastos de paciente MPS IVA logrando actividades relativamente elevadas desde las primeras 24 horas después de la transfección [6]. Otros estudios *in vitro* realizados con vectores AAV han evaluado la coexpresión del gen GALNS con el gen SUMF1, el cual codifica para la producción de la enzima generadora de formilglucina implicada en la activación de las sulfatasas a partir de la transformación de la cisteína a formilglucina en el sitio activo [6] [21]. Los resultados de estos estudios mostraron un aumento de la actividad de GALNS, aunque los niveles de la actividad pueden presentar variaciones dependiendo de la célula transducidas y el promotor empleando [1]. Dentro de los otros potenciales vectores usados en terapia génica para un tratamiento efectivo a largo plazo se encuentran los vectores retrovirales los cuales tienen la capacidad de integrar la carga transgén al genoma de la célula diana, logrando de esta manera una expresión a largo plazo y una transferencia de esta integración a la progenie de la célula diana cuando se produzca la división celular [10]. Para el caso de Morquio A, los primeros estudios en terapia génica se realizaron con vectores retrovirales derivados del virus de leucemia murina en fibroblastos, linfocitos de pacientes normales y MPS IVA y en queratinocitos de ratón. Los resultados de este estudio mostraron niveles elevados de actividad enzimática en comparación con los valores de referencia de pacientes normales [6] [17].

Los vectores lentivirales (LV) son retrovirus no oncogénicos que poseen la capacidad de integrarse al azar en la parte activa del genoma de la célula diana y de esta manera logra la expresión a largo plazo y a la vez la transmisión de la integración a la progenie de la célula infectada cuando ocurra la división celular, este vector tiene la capacidad de transducir células en división o quiescentes [10][22][13]. Estudios realizados en enfermedades metabólicas implementando vectores lentivirales han demostrado la alta eficiencia de estos vectores de transferir el transgen a células del hígado [10]. Otros estudios *in vivo* han evaluado la efectividad de los vectores lentivirales y la coexpresión del gen GALNS y el gen SUMF1. Los resultados obtenidos demostraron que los niveles de actividad de la enzima GALNS se aumentan en HEK 293 y fibroblastos MPS IVA cuando estos son transducidos con vectores lentivirales GALNS y se observó un aumento mayor en la actividad de GALNS cuando se transducen con vectores lentivirales GALNS y lentivirales SUMF1 [13].

Sin embargo, no se ha realizado estudios en terapia génica para la enfermedad de Morquio A que evalúen el efecto terapéutico de los niveles de actividad enzimática de GALNS, mediante el seguimiento de biomarcadores primarios y secundarios.

### **Objetivo general**

Caracterizar los niveles de expresión y efectos de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) sobre Fibroblastos MPS IV y HEK 293 transducidos con vectores virales.

### **Específicos**

1. Caracterizar la eficiencia de transducción de vectores lentivirales y adenoasociados en cultivo celular.
2. Caracterizar los niveles del glicosaminoglicano queratán sulfato en fibroblastos MPS IV A humanos después de la transducción con vectores lentivirales y adenoasociados.
3. Caracterizar los niveles de hexosaminidasa total en fibroblastos MPS IV A humanos transducidos con vectores lentivirales y adenoasociados.



## **Metodología:**

### **Para el primer objetivo específico:**

#### **1. Producción de vectores**

La producción y cuantificación de vectores AAV y lentivirales se llevó a cabo en trabajos previos realizados en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo [12][13].

#### **2. Cultivo de células HEK-293 y Fibroblastos MPS IVA**

Células HEK293 y Fibroblastos MPS IVA (donados por el Dr. Roberto Giugliani, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil) fueron cultivadas en placas de cultivo celular con 10mL de medio DMEM completo (suero fetal bobino 10%, estreptomicina y ampicilina 50U/50U, piruvato de sodio 1mM, suplementado con aminoácidos no esenciales 0.1 mM, L-glutamina 2 mM). Las células se incubaron en 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada 48 a 72 horas. Al observar el 80% de confluencia, las células se desprendieron mediante protocolo de tripsina 1X. La cuantificación celular se realizó con Azul de tripan y cámara de Neubauer. En cajas de cultivo de 12 pozos se sembraron 50.000 células con un 1 ml de medio de cultivo descrito anteriormente. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3. Transducción de células HEK-293 y Fibroblastos MPS IVA**

La transducción de las células se realizó en la placa de 12 pozos después de la incubación durante 48 horas. El cambio del medio se llevó a cabo 2 horas antes para la estabilización de las células y se procedió a la introducción de los vectores. Para los vectores AAV se realizaron las siguientes proporciones con tres repeticiones cada uno: GALNS 3.58 x10<sup>12</sup> genomas virales (gv) (1), GALNS 3.58 x10<sup>12</sup> gv/ SUMF1 3.97 x10<sup>12</sup> gv (1:1) y GALNS 3.58 x10<sup>12</sup>/ SUM F1 1.19x10<sup>13</sup> gv (1:3). Para los vectores lentivirales se establecieron las siguientes concentraciones cada uno con tres repeticiones: GALNS 1 MOI, GALNS 5 MOI Y GALNS 1 MOI: SUMF1 3 MOI. Donde un MOI corresponde a un vector por célula. Las células transducidas se incubaron durante 48 horas a 37°C con una humedad de 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas las 48 horas se descartó el medio de cultivo y se lisaron las células mediante deoxicolato de sodio al 1% para determinar los niveles de actividad enzimática. Los lisados celulares se mantuvieron en tubos eppendorf de 1.5ml a -20°C.

#### 4. Actividad de GALNS en células HEK-293, Fibroblastos MPS IVA y Fibroblastos normales.

##### 5.1 Cuantificación de proteína mediante la técnica de MicroLowry

A partir de los lisados celulares se realizó la cuantificación de proteína mediante la técnica de MicroLowry con modificaciones [8]. La concentración de proteína se determinó empleando una curva de albumina sérica humana entre 0.072 y 1.2 mg/ml. Se establecieron dos replicas por cada muestra para la cuantificación [13] [23].

**5.2 Cuantificación de actividad enzimática.** A partir de los datos de concentración de cada muestra se determinó la actividad enzimática específica mediante el método de Van Diggelen *et al.* [24]. Este método mide la actividad enzimática GALNS empleando el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactopiranosido-6-sulfato de sodio (Toronto Chemical Research). Para realizar este procedimiento se utilizaron 10 $\mu$ L de muestra y 20 $\mu$ l del sustrato concentración 2 mM [24] [6]. La reacción se incubó en tubos de ensayo durante 16 horas a 37°C y posteriormente se adicionaron 2 $\mu$ L de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae*. La reacción se mantuvo a 37°C durante 2 horas. La reacción se detuvo con 1300  $\mu$ L de buffer Glicina Carbonato 0.17 M. La fluorescencia se midió a  $\lambda_{ex}366/\lambda_{em}450$ . Como controles se utilizaron fibroblastos humanos no afectados (donados por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana), los cuales se cultivaron e incubaron bajo las mismas condiciones de las HEK293 y fibroblastos MPS IVA. La actividad específica se determinó empleando la siguiente ecuación [13] [25]:

$$\frac{u}{mg} = \frac{\left[ \frac{(Fluorescencia\_muestra - blanco)}{(fluorescencia\ de\ 1nmol\ 4 - MU)} \right]}{horas\ de\ incubacion} \cdot mg\ de\ proteina\ por\ ensayo$$

#### 5. Medición genomas virales y expresión del vector.

Para el análisis del genoma y ARNm de los vectores, se sembraron 5x10<sup>4</sup> células HEK293 en placas de 12 pozos, como se describió previamente. Las células fueron transducidas con los vectores AAV y lentivirales, bajo las proporciones descritas

anteriormente. Se emplearon como controles células HEK293 y fibroblastos MPS IVA sin transfectar. Luego de 48 horas las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 1200 rpm para recuperar el pellet, el cual se almacenó a -20°C. El ADN genómico y ARN total fueron extraídos empleando el reactivo TRIzol (life technologies™), el procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las transducciones fueron realizadas por triplicado.

Para la identificación del ADN viral se emplearon los cebadores TOMF22 (5'-ACAGGGCCATTGATGGCCTCAACCTCCT-3') y TOMF34R (5'-GCTTCGTGTGGTCTTCCAGATTGTGAGTTG-3') los cuales son específicos para el ADNc de GALNS humano y amplifican un fragmento de 598 pb. Los productos de la PCR convencional fueron confirmados en gel de agarosa al 2% empleando bromuro de etidio.

Para el análisis del ARNm viral, la primera cadena de ADN se sintetizó por RT-PCR mediante el kit First strand cDNA synthesis kit (Fermentas), el procedimiento RT-PCR se realizó bajo las indicaciones del protocolo de Thermo Scientific [26], el producto resultante de reacción se usó para realizar una amplificación con TOMF23 (5'-ACAGGGCCATTGATGGCCTCAACCTCCT-3') y TOMF34R (5'-GCTTCGTGTGGTCTTCCAGATTGTGAGTTG-3') y con cebadores para el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) (gen constitutivo), GADPHS 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' y GADPHR 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. Con el fin de confirmar la retrotranscripción y la amplificación de 550 pb (para el gen GADPH) y de 235pb (para el gen ADNc de GALNS humano), se realizó una electroforesis al 2% de agarosa empleando bromuro de etidio.

Adicionalmente, se intentó analizar la transducción y expresión del gen GALNS mediante PCR en tiempo real con el reactivo SYBR® Green PCR master mix (Applied Biosystems), el procedimiento se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante [27]. A partir de los productos de RT-PCR de HEK293 transducidas con vectores AAV y lentivirales se empleó 1 µg de ADN genómico o ADNc los cuales fueron mezclados con

la mezcla maestra y los cebadores TOMF23-TOMF34R. La amplificación y cuantificación se realizó en el equipo light cycler 1.5 Roche y los resultados se analizaron mediante el programa Lightcycler software (build 4.1.1.2.1). Desafortunadamente, tras diferentes intentos de cuantificación no fue posible realizar la amplificación del gen, incluso empleando un plásmido portando el gen GALNS (datos no mostrados).

### **Metodología para el segundo objetivo**

Para evaluar la reducción de las acumulaciones de GAG se emplearon fibroblastos MPS IV A cultivados bajo las condiciones previamente descritas. Se sembraron  $5 \times 10^4$  células en placas de doce pozos en medio de cultivo completo. Después de la incubación de 72 horas a 37 °C y humedad de 5% de CO<sub>2</sub>, se realizó la adición de los vectores lentivirales en concentraciones: GALNS 1 MOI, GALNS 5 MOI Y GALNS 1 MOI: SUMF1 3 MOI, dos horas antes de la adición de los vectores se removió y cambió el medio de cultivo para estabilizar las células. Pasadas las 48 horas de incubación bajo las mismas condiciones anteriormente descritas las células fueron lisadas con doxicolato de sodio al 1%. EL queratán sulfato fue identificado en los lisados celulares mediante Dot-Blot con cámara de microfiltración Bio-Dot<sup>®</sup> SF de BioRad, el procedimiento se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante (BioRad) [28]. Para la identificación del queratán sulfato se empleó un anticuerpo monoclonal anti-queratán sulfato (Santa Cruz Biotechnology). Como control negativo se empleó el lisado de fibroblastos de individuos normales cultivados y lisados bajo las mismas condiciones. No se determinó la reducción de acumulación de queratán sulfato en lisados celulares de fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores AAV debido a que el volumen requerido para el procedimiento era insuficiente en todos los tratamientos.

### **Metodología para el tercer objetivo**

Para determinar los niveles de actividad específica y volumétrica de la enzima lisosomal hexosaminidasa la cual es un indicador secundaria de la enfermedad de Morquio A, se emplearon lisados de fibroblastos MPS IV A cultivados bajo las condiciones descritas anteriormente. Se sembraron  $5 \times 10^4$  células en placas de doce pozos en medio de cultivo completo. Después de la incubación de 72 horas a 37 °C y humedad de 5% de CO<sub>2</sub> fueron

transducidos con vectores lentivirales en concentraciones: GALNS 1 MOI, GALNS 5 MOI Y GALNS 1 MOI: SUMF1 3 MOI, se estableció un control con niveles normales de Hexosaminidasa de fibroblastos de individuos no afectados cultivados bajo las mismas condiciones. Al cabo de las 48 horas se realizó el lisado de fibroblastos MPSVA transducidos y fibroblastos de individuos normales mediante doxicolato de sodio al 1%. No se realizó la cuantificación de los niveles de actividad de hexosaminidasa en lisados celulares de fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores AAV debido a que el volumen requerido para el procedimiento era insuficiente en todos los tratamientos.

La medición de la actividad específica y volumétrica de la enzima hexosaminidasa se realizó mediante el protocolo de Shapira et al. (1989) [25], este método mide la actividad específica mediante el sustrato fluorogénico 4-metilumbelliferil 2-acetamida 2-deoxi-β-D-glucopiranosido. Para llevar a cabo el procedimiento se tomó el volumen de lisado celular de cada muestra que correspondiera a 0.008 mg, se llevó hasta 50 ml de volumen final con BSA al 0.6% (diluida en buffer citrato fosfato 0.01M a pH 4.4) y se adicionaron 200 μl de sustrato. La reacción se incubó durante 20 minutos a 37°C en el baño serológico. La reacción se detuvo con buffer glicina como se describió previamente para la actividad GALNS. La fluorescencia de cada muestra se midió a  $\lambda_{ex}366/\lambda_{em}450$ . La actividad específica de hexosaminidasa se determinó aplicando la siguiente ecuación [13]

$$\frac{u}{mg} = \frac{(Fluorescencia - blanco) * 3}{mg \text{ de proteína por ensayo} * (Fluorescencia de 1nmol 4 - MU)}$$

La actividad volumétrica de hexosaminidasa se determinó aplicando la siguiente ecuación.

$$\frac{unidad}{mililitro} = \frac{(Fluorescencia - blanco) * 3}{ml \text{ de muestra} * (Fluorescencia de 1nmol 4 - MU)}$$

## Estadística

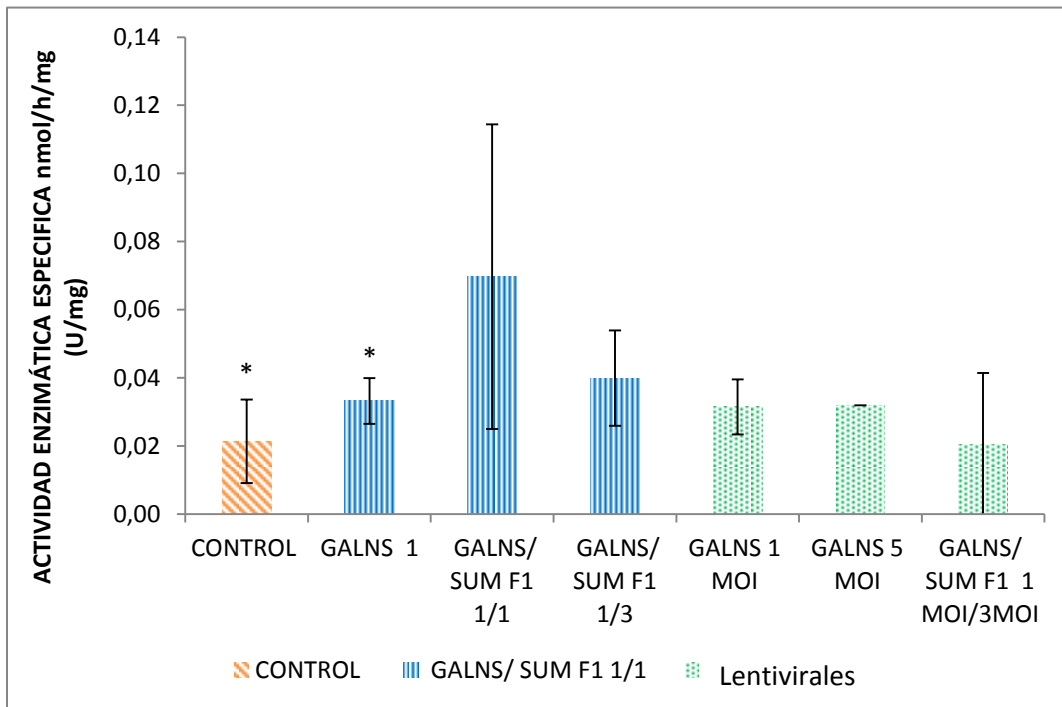
Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa IBM SPSS statistics 19, los resultados se analizaron mediante la prueba de contraste ortogonales, la prueba de Dunnett y la prueba de Bonferroni (si el total de datos no presentaba una diferencia significativa) con un intervalo de confianza del 95%.

## RESULTADOS:

### Para el primer objetivo específico:

#### - Transduccion HEK293

Se realizó la transducción de células HEK293 con vectores AAV en proporciones: 0 gv (control), GALNS  $3.58 \times 10^{12}$  gv, GALNS  $3.58 \times 10^{12}$  gv/ SUMF1  $3.97 \times 10^{12}$  gv (1:1) y GALNS  $3.58 \times 10^{12}$ /SUMF1  $1.19 \times 10^{13}$  gv (1:3). La transducción con vectores lentivirales se realizó con concentraciones: 0 (control), 1 y 5 MOI de GALNS y en la proporción GALNS 1 MOI: SUMF1 3 MOI. La transducción se llevó a cabo durante 48 horas, pasado este periodo se realizó la lisis celular para la cuantificación de la actividad enzimática de GALNS. La figura 1 muestra la actividad enzimática específica de GALNS correspondiente a los lisados del cultivo de HEK 293 transducidos con vectores lentivirales y AAV.



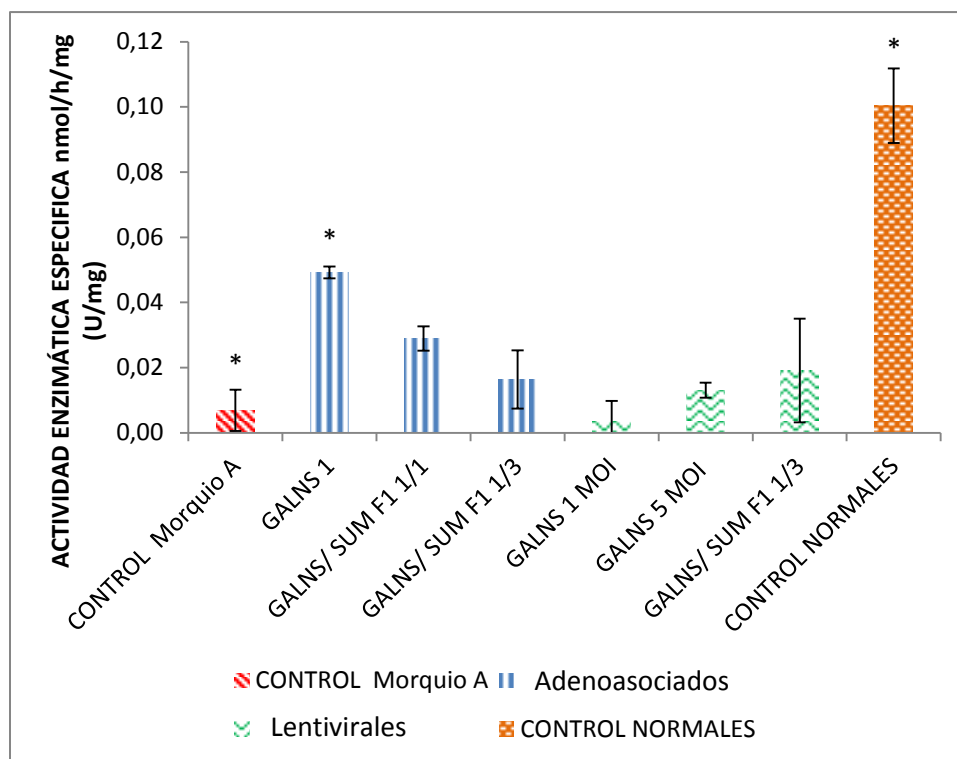
**Figura 2.** Actividad enzimática específica de GALNS correspondiente a los lisados celulares de HEK293 transducidos con vectores AAV y Lentivirales. Donde las HEK293 transducidas con vectores AAV corresponde a Control (0 gv), GALNS 1 ( $3.58 \times 10^{12}$  gv), GALNS  $3.58 \times 10^{12}$  gv / SUMF1  $3.97 \times 10^{12}$  gv (1:1) y GALNS  $3.58 \times 10^{12}$ /SUM F1  $1.19 \times 10^{13}$  gv (1:3) y las HEK293 transducidas con vectores Lentivirales corresponden a concentraciones: GALNS 1 MOI, GALNS 5 MOI Y GALNS 1 MOI: SUMF1 3 MOI. \* =  $p < 0.05$ .

La figura 2 muestra que las células HEK293 transducidas presentan una mayor actividad enzimática de GALNS que los controles ( $0.02 \pm 0.01$  u/mg), los datos de los controles de HEK293 ( $P=0.014$ ) presentan una diferencia significativa con respecto a los tratamientos. Se puede observar también que la actividad con niveles más elevados para los vectores AAV se presentan en la proporción GALNS/SUMF1 1/1 ( $0.07 \pm 0.04$  u/mg). Sin embargo, los datos de actividad de GALNS/SUMF1 en proporción 1/1 no presenta una diferencia estadísticamente significativa con las demás proporciones de AAV ni el control ( $P=0.726$ ). La actividad que se presentó en proporción GALNS/SUMF1 1/3 es la segunda más elevada ( $0.04 \pm 0.01$  u/mg), no obstante los datos no son estadísticamente diferentes de los demás tratamientos ni con el control ( $P=0.726$ ). Sin embargo la actividad de GALNS ( $0.03 \pm 0.06$  u/mg) con la proporción GALNS1 presentan diferencia significativas con los otros tratamientos y el control ( $P=0.002$ ).

En las HEK293 transducidas con vectores lentivirales (figura 2) se observa que hay un aumento en los niveles de actividad de GALNS con respecto al control en concentraciones de 1 MOI ( $0.031 \pm 0.008$  u/mg) y 5 MOI ( $0.032 \pm 0$  u/mg) los cuales presentan una actividad enzimática similar. No obstante los datos de actividad no presentan una diferencia significativa entre ellos ni con el control tanto en células transducidas con 1 MOI ( $P=0.132$ ) como con 5 MOI ( $P=0.533$ ). La actividad de GALNS reportada para el tratamiento GALNS/SUMF1 en proporciones 1:3 ( $0.02 \pm 0.02$  u/mg) es la menor para las células transducidas con vectores lentivirales, estos datos de actividad no presenta diferencias significativas con los demás tratamientos ni con el control ( $P=0.533$ ).

#### - **Transduccion fibroblastos MPS IVA humanos**

La transducción de los fibroblastos MPS IVA humanos se realizó de igual manera con vectores AAV y lentivirales, para la transducción con vectores AAV y lentivirales en las proporciones previamente descritas. La transducción se llevó a cabo durante 48 horas, pasado este periodo se realizó la lisis celular para la cuantificación de la actividad enzimática de GALNS. La figura 3 muestra la actividad enzimática específica de GALNS correspondiente a los lisados del cultivo de fibroblastos MPS IVA humanos transducidos con vectores lentivirales y AAV. Se utilizó un control de fibroblastos normales, los cuales fueron lisados para determinar la actividad enzimática de GALNS, la actividad enzimática obtenida se estableció como un punto de referencia de actividad de GALNS normal.



**Figura 3.** Actividad enzimática específica de GALNS correspondiente a los lisados celulares de fibroblastos MPS IVA humanos transducidos con vectores AAV y Lentivirales. Donde los fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores AAV corresponde a Control (0 gv), GALNS 1 ( $3.58 \times 10^{12}$  gv), GALNS  $3.58 \times 10^{12}$  gv / SUMF1  $3.97 \times 10^{12}$  gv (1:1) y GALNS  $3.58 \times 10^{12}$  / SUM F1  $1.19 \times 10^{13}$  gv (1:3) y los fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores Lentivirales corresponden a concentraciones: GALNS 1 MOI, GALNS 5 MOI Y GALNS 1 MOI: SUMF1 3 MOI (1/3). Finalmente actividad control normal. \* =  $p < 0.05$ .

En la figura 3 se observa que los fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores AAV presentan mayores actividades enzimáticas GALNS que el control. Los datos de actividad obtenidos de cada uno de los tratamientos presentan una diferencia significativa con respecto a el control de MPS IV ( $P=0.014$ ). También se observa que los fibroblastos transducidos con vectores AAV presentan una mayor actividad de GALNS en proporciones GALNS 1 ( $0.05 \pm 0.001$  u/mg). Los datos de actividad de GALNS 1 ( $3.58 \times 10^{12}$  gv) presentan una diferencia estadísticamente significativa con los demás tratamientos y con el control de fibroblastos MPS IVA ( $P=0.002$ ). Por el contrario los datos de actividad de GALNS obtenidos con GALNS 1/ SUM F1 1 (1:1) ( $0.03 \pm 0.003$  u/mg) y GALNS 1 / SUM F1 3 (1:3) ( $0.02 \pm 0.008$  u/mg) no presentan diferencias significativas entre ellos ni con el control de fibroblastos MPS IVA ( $P=0.726$ ), pero si presentan diferencias significativas con el control de fibroblasto normales ( $P=0.000$ ). También se puede observar que al comparar los fibroblastos MPS IVA tratados con los fibroblastos normales (figura 3) se evidencia que los transducidos con AAV y a una proporción de GALNS 1 presentan

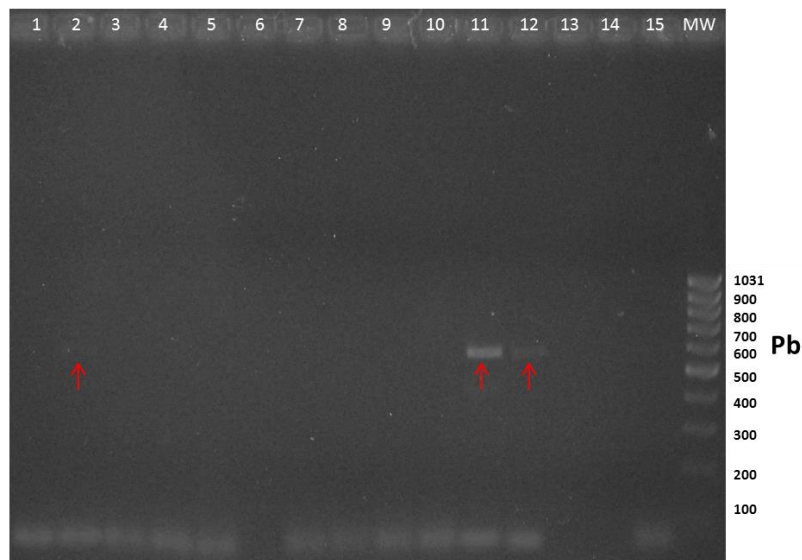


una actividad equivalente al 50% de la actividad normal ( $0.10 \pm 0$  u/mg). Los datos de actividad de los fibroblastos transducidos con GALNS 1 presentan una diferencia significativa con respecto al control de fibroblastos normales ( $P=0.000$ ).

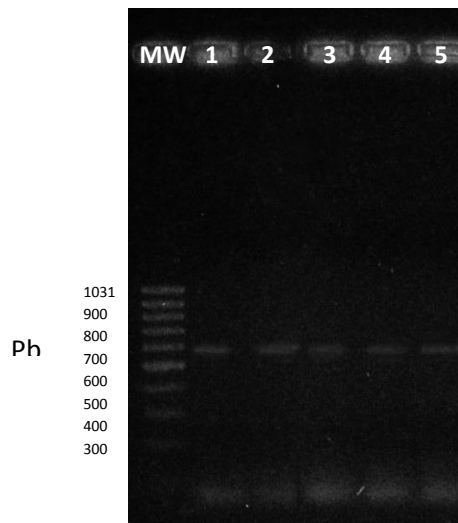
En las actividades de GALNS de fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores lentivirales se observa (figura 3) que hay un aumento secuencial de la actividad de GALNS a mayor concentración del vector. Sin embargo, los valores de actividad GALNS obtenidos no presentan una diferencia estadísticamente significativa con el control de fibroblastos MPS IVA ( $P=1.000$ ). El nivel más elevado de actividad de GALNS de fibroblastos MPS IVA transducidas con vectores lentivirales se observa (figura 3) a una proporción de GALNS 1 MOI/ SUM F1 3 MOI ( $0.02 \pm 0.01$  u/mg), no obstante los datos obtenidos con esta proporción no presentan una diferencia significativa entre los demás tratamientos y el control de fibroblastos MPS IVA ( $P=1.000$ ), esta actividad comparada con el control de fibroblastos de un individuo normal equivalente al 20% de la actividad normal. Los datos de actividad de células transducidas con la proporción GALNS 1 MOI/ SUM F1 3 MOI presentan una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de fibroblastos normales ( $P=0.000$ ). La actividad de GALNS para el tratamiento 5 MOI ( $0.01 \pm 0.002$  u/mg) fue la segunda actividad con el nivel más alto la cual equivale a un 10% de la actividad de un fibroblasto normal. Sin embargo, los datos de actividad evidenciados no son estadísticamente diferentes con los demás tratamientos ni con el control de fibroblastos MPS IVA ( $P=1.000$ ). De igual manera para los datos de actividad del tratamiento GALNS 1 MOI ( $0.003 \pm 0.006$  u/mg) los cuales fueron los menores para fibroblastos transducidas con vectores lentivirales, estos datos no son estadísticamente diferentes de los demás tratamientos ni con el control MPS IVA ( $P=1.000$ ).

- **Expresión del vector y medición de genomas virales.**

Después de observar los resultados de actividad enzimática de GALNS en HEK293 se procedió a realizar la extracción de ARN completo y ADN de HEK293 transducidas con vectores AAV y lentivirales. Con el ARN completo extraído se realizó la síntesis de la primera cadena de ADNc, y amplificación del gen constitutivo GADPH y del gen GALNS. Para confirmar la amplificación se realizó una electroforesis en un gel agarosa al 2% empleando bromuro de etidio. La figura 4 y 5 muestra la banda de amplificación de 550 pb para gen constitutivo GADPH.

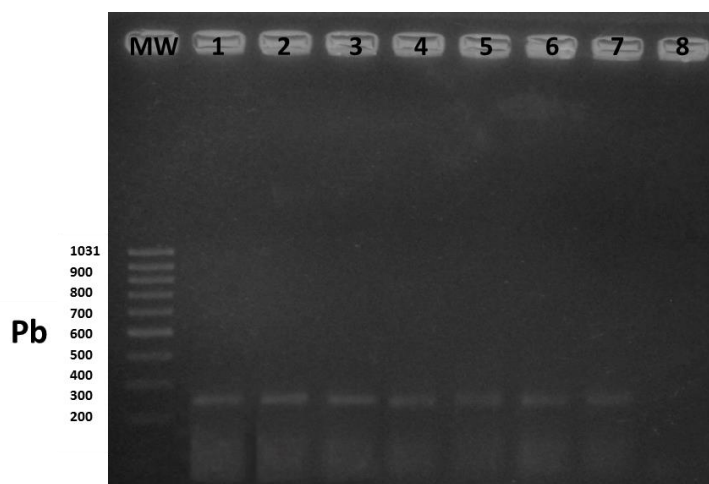


**Figura 4.** Gel de electroforesis mostrando las bandas de amplificación del gen constitutivo GADPH. Las muestras se distribuyen en los carriles de la siguiente manera: 1-7 corresponden a las HEK293 transducidas con los vectores AAV, 8-11 a las HEK293 transducidas con vectores lentivirales, 12 y 13 corresponden a los controles, el carril 14 corresponde al blanco de la RT-PCR y el 15 corresponde a el blanco de la amplificación con el gen housekeeping. Los carriles 1,2 y 3 corresponden a la proporción GALNS 1 (GALNS  $3.58 \times 10^{12}$  gv), 4,5 y 6 corresponden a la proporción GALNS 1/ SUM F1 1 ( $3.58 \times 10^{12}$  gv/ :  $3.97 \times 10^{13}$  gv), 7, 8 y 9 corresponden a la proporción GALNS 1/ SUM F1 3 ( $3.58 \times 10^{12}$  gv) :  $1.191 \times 10^{13}$  gv). Los carriles 9, 10 y 11 corresponden a las Hek293 transducidas con vectores lentivirales a una concentración de 5 MOI. El carril 12 MW corresponde al control sin tratar. Peso molecular (Mass ruler low range DNA. Fermentas).



**Figura 5** Gel de electroforesis mostrando bandas de amplificación gen constitutivo (GADPH). Las muestras se distribuyen en los carriles de la siguiente manera: carril del 1-3 corresponden a las HEK293 transducidas con los vectores AAV, 4-8 a las HEK293 transducidas con vectores lentivirales y 9 corresponde al blanco de la RT-PCR y el 10 al blanco de la PCR con el gen GADPH. Los carriles 1,2 y 3 corresponden a la proporción GALNS 1 (GALNS  $3.58 \times 10^{12}$  gv), 4 y 5 corresponden a la concentración 5 MOI, 6, 7 y 8 corresponden a la concentración 1 MOI. MW peso molecular (Mass ruler low range DNA. Fermentas).

En la figura 4 se puede observar la presencia de la banda esperada en las muestras 2 (GALNS 1), 11 (GALNS 5 MOI) y 12 (control sin tratar), y en la figura 5 se observa levemente la presencia de la banda esperada en las muestras 1, 2 y 3 (GALNS 1) y en la 4 y 5 (5 MOI). Esto resultados confirma la amplificación del gen constitutivo, validando así la RT-PCR. Con las muestras que presentaron la amplificación del gen GAPDH se realizó la amplificación del ADNc de GALNS humano. Los productos de PCR fueron confirmados en gel de agarosa al 2% empleando bromuro de etidio. La figura 6 muestra la banda de amplificación de 235 pb que corresponde al ADNc de GALNS.



**Figura 6.** Gel de electroforesis mostrando los resultados de PCR ADNc GALNS humano, Las muestras se distribuyen en los carriles de la siguiente manera: 1, 2 y 3 HEK293 transducidas con vectores AAV en proporción GALNS 1 ( $GALNS\ 3.58 \times 10^{12}$  gv), 4,5 y 6 HEK293 transducidas con vectores lentivirales a una concentración de GALNS 5 MOI. El carril 7 corresponde al control HEK293 sin transducción. El carril 8 corresponde al blanco PCR ADNc GALNS. Peso molecular (Mass ruler low range DNA. Fermentas).

Los resultados de amplificación de ADNc de GALNS muestran la presencia de la banda esperada de 235 pb, para todas las muestra de HEK2983 transducidas. Al establecer una comparación entre la banda de control de HEK293 sin tratar con las bandas de las células transducidas se observa una mayor en intensidad en las células transducidas, lo cual indica la expresión del gen GALNS transferido por los vector lentivirales y AAV. Las mayores intensidades se observa en las muestras provenientes de células transducidas con vectores AAV en concentraciones de  $3.58 \times 10^{12}$  gv.

A partir del ADN genómico extraído de las células transducidas con vectores AAV y lentivirales, se realizó una amplificación del ADN viral empleando cebadores para amplificar un fragmento del ADNc presente en los vectores. Los productos de PCR fueron confirmados en un gel de agarosa al 2% empleando bromuro de etidio. La figura 7 muestra las bandas de amplificación de 598 pb que corresponde al ADNc de GALNS.



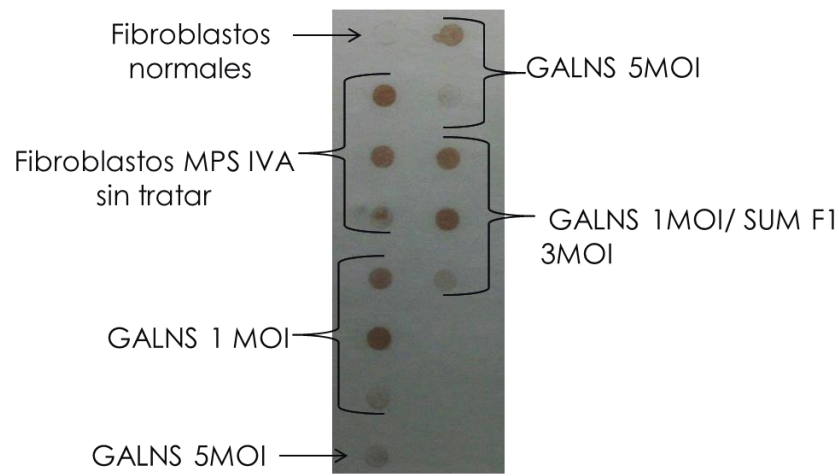
**Figura 7.** Gel de electroforesis confirmado las bandas de ADNc GALNS humano a partir de la extracción de ADN de HEK293 transducidos con AAV y Lentivirales. Las muestras se distribuyen en los carriles de la siguiente manera: 1-8 corresponden a las HEK293 transducidas con los vectores AAV, 9 corresponden al control HEK293 sin transducir, 10-18 corresponden a HEK293 transducidas con vectores lentivirales y el carril 19 corresponde al blanco de PCR ADNc GALNS.

La figura 7 muestra la presencia de la banda esperada de 598 pb que correspondiente a un fragmento del ADNc de GALNS presente en los vectores. La banda se observó en la primera replica de células HEK293 transducidas con AAV  $3.58 \times 10^{12}$  gv y en las tres réplicas de HEK293 transducidas con vectores lentivirales en proporciones GALNS 1MOI/ SUMF1 3 MOI. Sin embargo, la intensidad de las bandas es muy leve por lo tanto se sugiere que la extracción de DNA con el reactivo TRIzol fue insuficiente. Los resultados confirman el ingreso del ADN viral al genoma de las células HEK293 lo cual se ve reflejado en las bandas de amplificación donde se observa la presencia del gen GALNS normal.

La cuantificación de la expresión del gen GALNS a partir de los productos RT-PCR de HEK293 transducidas con vectores AAV y lentivirales no pudo ser evaluada mediante PCR en tiempo real. Se realizaron diferentes intentos de amplificación variando las condiciones de reacción y concentración de los cebadores y ADN tanto con las muestras problema como con un plásmido recombinante portando el ADNc de GALNS humano (control positivo), observándose en todos los casos una respuesta negativa (resultados no mostrados). Las reacciones de PCR fallidas pueden ser ocasionadas por: insuficiente ADNc en las muestras, baja calidad de ADNc, degradación de las muestras, pipeteo incorrecto, reducción del número de ciclos en el termociclador, formación de dímeros e inactivación de la polimerasa [28].

**Para el segundo objetivo específico:**

A partir de los lisados celulares de fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores lentivirales se realizó un DOT-BLOT para la determinación de queratán sulfato empleando un anticuerpo anti-queratán sulfato. La figura 8 muestra los resultados obtenidos a partir del DOT-BLOT. La coloración de los puntos indica la presencia de queratán sulfato en la muestra.



**Figura 8.** DOT-BLOT anti-queratán sulfato. La coloración de las muestras (puntos) indica la acumulación de queratán sulfato en el pozo. La intensidad de la coloración indica una mayor presencia de queratán sulfato, sin embargo esta técnica es cualitativa y no cuantitativa lo cual permite establecer diferencias en la presencia, ausencia e intensidad de coloración (acumulación de queratán en el pozo).

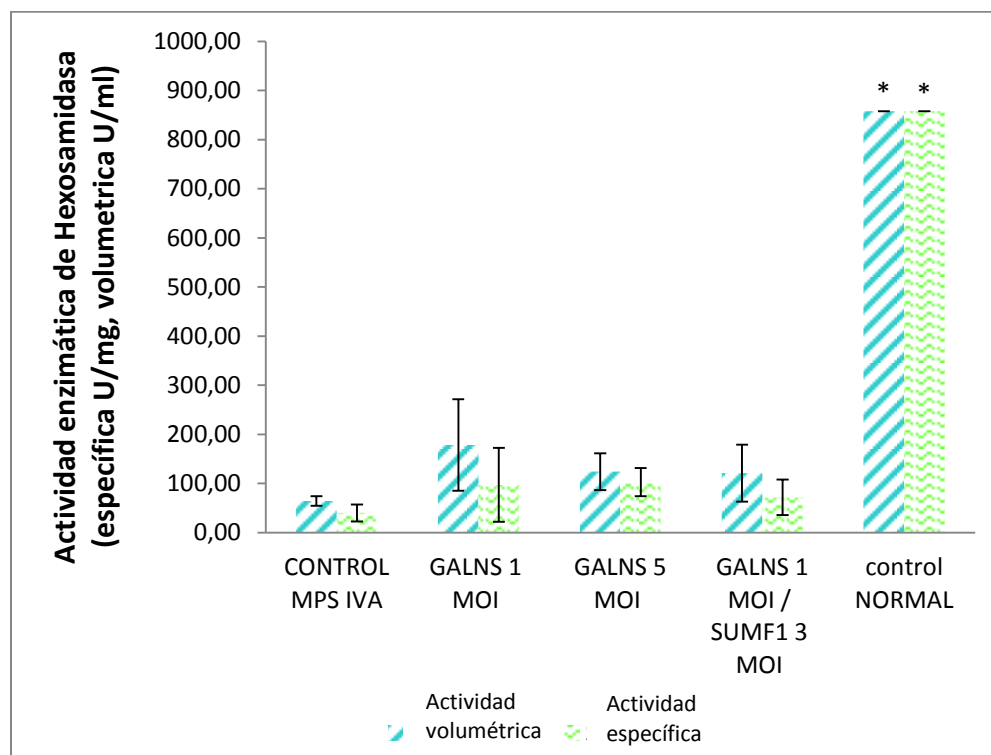
En la figura 8 se observa que los fibroblastos normales presentaron una baja concentración de queratán en comparación con los fibroblastos MPS IVA sin tratar donde la intensidad es alta. Al comparar los resultados de los fibroblastos MPS IVA transducidos se observa que las muestras 1 y 3 a concentraciones de 5 MOI presentan una acumulación menor ya que su intensidad es leve a comparación de las de otras muestras y con respecto al control negativo de fibroblastos normales se observa una intensidad mayor pero casi similar. Sin embargo, para la tercera muestra a concentración 1 MOI y la 3 muestra a concentración GALNS 1 MOI/ SUM F1 3 MOI presentan una intensidad menor pero que no se iguala a las muestras con concentración 5 MOI.

### Para el tercer objetivo específico:

#### -Actividad de la enzima lisosomal Hexosaminidasa

Se cuantificaron los niveles de actividad hexosaminidasa total para reconocer si se presenta alguna alteración en esta enzima por efecto de los tratamientos establecidos en fibroblastos MPS IVA.

A partir de lisados celulares de fibroblastos MPS IVA humanos transducidos con vectores lentivirales, en las proporciones previamente descritas, se cuantificó la actividad hexosaminidasa total específica y volumétrica (figura 9). Como control normal se emplearon lisados celulares de fibroblastos de individuos normales los cuales fueron cultivados bajo las mismas condiciones.



**Figura 9.** Actividad enzimática volumétrica y específica de Hexosaminidasa correspondiente a los lisados celulares de fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores y Lentivirales. Donde los fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores AAV corresponde a los fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores Lentivirales corresponden a concentraciones: GALNS 1 MOI, GALNS 5 MOI Y GALNS 1 MOI: SUMF1 3 MOI. Finalmente actividad control normal. \* =  $p < 0.05$ .

Se observa un aumento en la actividad volumétrica hexosaminidasa en los fibroblastos transducidos en contraste con el control de fibroblastos MPS IVA ( $64.43 \pm 9.50$  u/ml). Sin embargo, los resultados de los controles MPS IVA no presenta diferencias significativas con los tratamientos ( $P=0.502$ ). La mayor actividad se presenta con la concentración GALNS 1MOI

(178.5 ± 93.07 U/ml), mientras que para las concentraciones GALNS 5 MOI (124.10 ± 37.6 U/ml) y GALNS 1 MOI/ SUMF1 3MOI (121.09 ± 57.99 U/ml) son similares. Todos los tratamientos presentan una diferencias significativa con respecto a los valores de actividad observados en los de fibroblastos normales (857.76 ± 0 U/ml) (P=0.000).

Con respecto a la actividad específica de hexosaminidasa total, esta mayor en fibroblastos tratados en comparación con el control de fibroblastos MPS IVA sin tratar (40.06 ± 17.18 U/mg). Sin embargo, los valores de actividad de fibroblastos tratados no presentan diferencias significativas con los del control (P=0.83). La concentración GALNS 5 MOI presentó la mayor actividad de hexosaminidasa total (102.92 ± 28.69 U/mg) en comparación con los demás tratamientos. Al igual que en la actividad volumétrica, todos los tratamientos presentan una diferencias significativa con respecto a los valores de actividad observados en los de fibroblastos normales (857.76 ± 0 U/mg) (P=0.000).

## **DISCUSIÓN**

La mucopolisacaridosis IVA (MPS IVA) o síndrome de Morquio A es una enfermedad autosómica recesiva causada por la deficiencia en la enzima lisosomal GALNS, la cual degrada el queratán sulfato y condroitin-6-sulfato [2][3]. Los pacientes con MPS IVA presentan características clínicas específicas debido a la acumulación de GAG en los lisosomas de diferentes tejidos principalmente en tejidos de córnea y hueso [4][3][5][6]. En busca de una solución efectiva para este síndrome se ha planteado diferentes tratamientos entre los cuales se encuentra la terapia de remplazo enzimático [1], así como también la terapia génica. Por tal razón en este proyecto se buscó evaluar el efecto, sobre biomarcadores primarios y secundarios de la enfermedad, que pueden presentar los niveles de actividad de GALNS en células HEK293 y fibroblastos humanos MPS IVA transducidos con vectores AAV y lentivirales. Se empleó un control de fibroblastos de pacientes normales para establecer parámetros normales de niveles de queratán sulfato, actividad enzimática de GALNS y de hexosaminidasa total, y de esta manera establecer comparaciones entre fibroblastos de pacientes normales y fibroblastos tratados con vectores AAV y lentivirales.

La transducción de las células HEK293 tratadas con vectores AAV presentan un incremento con respecto al control sin tratar. Los mayores niveles de GALNS se presentaron con los tratamientos



GALNS/ SUMF1 en proporciones 1:1 donde la actividad se aumentó 3,5 veces con respecto al control, y GALNS/SUMF1 1:3 con un incremento de 2 veces en comparación con el control. Alméciga-Díaz et al. [3] y Barbosa [13] reportaron un aumento de la actividad de GALNS cuando se realizaba la coexpresión con el gen SUMF1, ya que esta es un factor esencial para la activación de las sulfatas [6][21][29]. Sin embargo, para los fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores AAV se observó una actividad GALNS de 0,03 U/mg para el tratamiento GALNS/SUMF1 (1:1) y de 0,02 U/mg para el tratamiento GALNS/SUMF1 (1:3) siendo esta la menor actividad reportada para fibroblastos tratados con AAV. Estos resultados de actividad de GALNS en los tratamiento GALNS/ SUMF1 (en proporciones 1:1 y 1:3) podrían estar relacionados con muerte celular causada por las concentraciones elevadas de vectores AAV, así como también con la variación de la actividad de GALNS dependiendo del tipo de célula transducida [3].

La transduccion con AAV-GALNS en HEK293 permitió un aumento en la actividad de GALNS (1.5 veces) con respecto al control de HEK293, similar a lo reportado previamente por Gutiérrez, et al. en células HEK293 y fibroblastos MPS IVA tansducidos con vectores AAV portando el gen GALNS [6]. De igual forma, para los fibroblastos transducidas con vectores AAV la mayor actividad de GALNS se presentó con el tratamiento GALNS 1 ( $3.58 \times 10^{12}$  gv/m), logrando una actividad 50% de la observada en fibroblasto humanos no afectados. Aunque los valores de actividad reportados en el trabajo de Gutiérrez et al. (2008) para fibroblastos no afectados fueron de 13.47 nmol/mg/h [6], mayores a los reportados en este trabajo se evidencia una aumento de la actividad de GALNS cuantificada después de las 48 horas de transducción como se observa en las figuras 2 y 3.

Los tratamientos realizados con vectores lentivirales reportan un aumento de actividad enzimática de GALNS con respectos a los controles sin tratamientos. Células HEK293 transducidas con lentivirales en proporciones GALNS 1 MOI y 5 MOI presentan un aumento de la actividad de GALNS correspondientes a 0.031 y 0.032 u/mg, similar a o reportado Herrera J (2012) [12] y Barbosa H (2012) [13]. Por el contrario los datos de actividad reportados en los tratamientos GALNS/SUMF1 en proporciones 1:3 son los de menor actividad (0.02 u/mg) en las HEK293 tratadas con lentivirales, lo cual contrasta con los resultados de Barbosa H (2012) donde la actividad aumenta en un 2.65 veces [13]. Esta diferencia puede estar asociada con una muerte

celular causada por las altas concentraciones de los vectores y la diferencia en las células empleadas entre los dos estudios.

Por el contrario los fibroblastos humanos MPS IVA transducidos con vectores lentivirales presentan una actividad que aumenta secuencialmente cuando aumentan las proporciones del vector con el gen GALNS y el aumento es mayor con la transducción del gen SUMF1 como se evidencia en la figura 3. Las mayores actividades se presentan con el tratamiento GALNS y SUMF1 en proporciones 1:3, logrando una actividad equivalente al 20% de la actividad de GALNS observada en fibroblastos normales. El incremento en la actividad se deben a la coexpresión de gen SUMF1 como se reporta en los trabajos Alméciga-Díaz et al. [3] y Barbosa H (2012) [13], en los cuales se reportan un incremento de 2.6 veces en la actividad de GALNS en comparación con los controles. En este trabajo se reporta un incremento de la actividad de GALNS de 2 veces en contraste al control de fibroblastos MPS IVA.

La amplificación el gen constitutivo GADPH solo se presentó en 7 muestras, lo cual puede sugerir que el método de extracción de ARN total mediante el reactivo TRIzol® fue insuficiente. Sin embargo, algunos protocolos como el establecido por Mewis, J en 2014 para la extracción de ARN a partir de muestras sanguíneas de aves para el posterior análisis de la expresión génica, se empleó el reactivo TRIzol LS® el cual difiere del TRIzol usado en este trabajo, ya que este posee una fórmula más concentrada para obtener una mayor eficiencia de extracción, de igual manera se usó el reactivo RNeasy® Kit de limpieza de MinElute el cual limpia y concentra el ARN que se encuentra en pequeños volúmenes [30] [31]. Este protocolo presento una alta eficiencia y calidad en la extracción de ARN completo. Por lo tanto se recomienda usar este protocolo para obtener una mayor calidad en la extracción de ARN.

A partir de las muestras en las que se confirmó la retro-transcripción se realizó la amplificación de ADNc de GALNS. Los tratamientos que presentaron amplificación para transducciones con vectores AAV fueron en proporciones en GALNS 1 ( $3.58 \times 10^{12}$  gv) y para las transducciones con vectores lentivirales se obtuvieron en proporciones GALNS 5 MOI. Sin embargo todos los tratamientos evidencian una actividad mayor al control excepto el tratamiento con vectores lentivirales en proporciones GALNS/ SUMF1 1:3, por lo tanto al evidenciarse actividad de GALNS mayor a las reportadas en los controles se entiende que el gen está expresando. De esta forma, la extracción con el reactivo TRIzol® no fue suficiente, por lo que se recomienda realizar

la extracción del RNA total con el protocolo establecido por Mewis, J et al. en 2014 anteriormente descrito [30][31].

Por otro lado la extracción de ADN de HEK293 transducidas con vectores AAV y lentivirales permitió la amplificación del ADNc GALNS en cuatro muestras (figura 7). A partir de estos resultados se podría sugerir que a las proporciones de los vectores AAV y lentivirales establecidos en este trabajo pueden llegar a transferir el gen de interés a las células HEK293 e incluirse en el genoma de la célula ya sea en el ADN súper enrollado o de forma episómica como es el caso de los virus AAV [6]. No obstante todos los tratamientos evidencian una actividad de GALNS mayor al control excepto el tratamiento con vectores lentivirales en proporciones GALNS/ SUMF1 1:3, lo cual sugiere la entrega del gene GALNS en dichos tratamientos. Estos resultados sugieren nuevamente, que la extracción de ADN total fue insuficiente con el reactivó TRIZOL®. En el trabajo desarrollado por Brestovac, B en 2014 evaluaron la eficiencia de extracción de ADN del kit XytXtract (de la casa comercial Xytogen) en diferentes tipos de líneas celulares, este kit demostró una alta eficiencia y rapidez para extraer DNA también se demostró que presenta una alta sensibilidad [32]. Por lo tanto se recomienda usar este kit de extracción para obtener muestras de ADN con una mayor calidad.

Los resultados de la figura 8 muestran el efecto en la reducción de acumulación de queratán sulfato a partir de los lisados celulares de fibroblastos MPS IVA transduccidos con vectores lentivirales y AAV. Se emplearon los lisados de fibroblastos afectados debido a que estos presentan la deficiencia en la enzima GALNS y por ende presentan acumulación de GAG [33][6]. Por esta razón el efecto terapéutico se evaluó directamente en la reducción de queratán sulfato y se contrastaron los resultados obtenidos con un control negativo de acumulación de queratán sulfato de lisados de pacientes no afectados.

La mayor reducción de acumulación de queratán sulfato se observó en una réplica del tratamiento 1 MOI, en dos réplicas del tratamiento GALNS 5 MOI y en una réplica del tratamiento GALNS 1 MOI/ SUMF1 3 MOI. La actividad de 5 MOI corresponde al 10% de la actividad de un fibroblastos normales y la actividad del tratamiento GALNS 1 MOI/ SUMF1 3 MOI corresponde al corresponden 20%. Los niveles cercanos al 10% de actividad pueden generar un efecto correctivo para obtener un fenotipo medio de uno severo en pacientes con enfermedades lisosomales [6]. La actividad de GALNS para estos tratamientos es igual o mayor

al 10% en comparación de la actividad de un control normal, por lo tanto se considera que los vectores lentivirales a estas proporciones pueden generar un efecto terapéutico en la reducción de queratán sulfato.

El efecto terapéutico también fue evaluado mediante determinación de la actividad hexosaminidasa total, la cual está involucrada en la ruta de degradación de los GAG y es una enzima que hidroliza los residuos terminales N-acetil-D-hexosamina de los GAG y otras macromoléculas de degradación lisosomal [13][34]. En el estudio de Tomatsu et al. En 2003 se reportó la elevación de la enzima hexosaminidasa en modelo animal murino portador de la enfermedad de Morquio A [34], pero hasta el momento no se ha reportado la evaluación de la actividad hexosaminidasa total en fibroblastos Morquio A. Por lo tanto, en este proyecto se buscó evaluar el efecto terapéutico de la transducción sobre un marcador secundario como es la alteración en los valores de actividad hexosaminidasa total [13]. Los resultados de actividades volumétricas y específicas reportan un aumento en comparación con los controles sin tratar, aunque sin alcanzar los valores observados en fibroblastos normales. Estos resultados coinciden con el estudio computacional realizado en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, en el cual se empleó una reconstrucción metabólica humana (recon 2) y a partir de este se obtuvo un modelo de MPS IVA en el cual se identificó una alteración en las actividades de diferentes vías metabólicas, entre las que se identificó una reducción en los niveles de actividad de la hexosaminidasa (Salazar D, Rodríguez A, Barreto G, González J, Alméciga-Díaz CJ, datos sin publicar). Por esta razón se podría considerar que los tratamientos realizados con vectores lentivirales en las proporciones establecidas en este trabajo pueden generar efectos en biomarcadores primarios y secundarios. Estos resultados también sugieren una alta eficiencia para los vectores lentivirales a una concentración de 5 MOI, los cuales evidenciaron un incremento en la actividad específica de GALNS de un 10% con respecto a un control normal y un incremento en la actividad específica y volumétrica de hexosaminidasa, y también sugiere una reducción en la acumulación de queratán sulfato.

## **CONCLUSIONES**

1. Se evidencio un aumento de la actividad de GALNS de 1.5 veces en células HEK293 y de 5 veces en fibroblastos MPS IV A transducidos con vectores AAV, así como un aumento de 1.5 veces en HEK293 y de 2 veces en fibroblastos MPS IV A transducidos con vectores lentivirales.
2. Se observa un incremento de la actividad enzimática GALNS en fibroblastos MPS IV A transducidos con vectores lentivirales y AAV correspondiente al 20% y al 50% de la actividad de un fibroblasto no afectado.
3. La expresión y transducción del gen GALNS fue observada para células HEK293 transducidas con vectores lentivirales y AAV.
4. La transducción con vectores lentivirales GALNS con o sin la coexpresión de SUMF1 permite disminuir la acumulación de queratán sulfato.
5. La transducción de fibroblastos MPS IV A con vectores lentivirales evidencian también un efecto terapéutico al aumentar los valores de actividad hexosaminidasa total.

## **RECOMENDACIONES**

1. Cuantificar la expresión y transducción del gen GALNS en células HEK293 mediante PCR en tiempo real, después de la transducción con vectores lentivirales y AAV.
2. Implementar otro método de extracción de RNA total y DNA en células HEK293 y fibroblastos.
3. Realizar una prueba cuantitativa para estimar los valores de reducción en la acumulación de queratán sulfato.
4. Evaluar el efecto terapéutico en fibroblasto MPS IV A mediante biomarcadores secundarios como la actividad de otras enzimas lisosomales.
5. Evaluar los efectos en biomarcadores primarios y secundario en fibroblastos MPS IVA transducidos con vectores AAV.
6. Evaluar los vectores lentivirales y AAV en modelo murino de la enfermedad de Morquio A.

## Referencias:

- [1] Almeciga-Diaz, C. J., Montano, A. M., Tomatsu, S., & Barrera, L. A. (2010). Adeno-associated virus gene transfer in Morquio A disease - effect of promoters and sulfatase-modifying factor 1. *Febs j*, 277(17), 3608-3619.
- [2] Tomatsu, S., Montano, A. M., Ohashi, A., Gutierrez, M. A., Oikawa, H., Oguma, T., Sly, W. S. (2008). Enzyme replacement therapy in a murine model of Morquio A syndrome. *Hum Mol Genet*, 17(6), 815-824
- [3] Coutinho, M. F., Lacerda, L., cia, & Alves, S. (2012). Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. *Biochemistry Research International*, 16.
- [4] Regier DS, Oetgen M, Tanpaiboon P. Mucopolysaccharidosis Type IVA. 2013 Jul 11. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK148668/>
- [5] Tomatsu, S., Montano, A. M., Oikawa, H., Smith, M., Barrera, L., Chinen, Y., Orii, T. (2011). Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment. *Curr Pharm Biotechnol*, 12(6), 931-945.
- [6] Gutierrez, M. A., Garcia-Vallejo, F., Tomatsu, S., Ceron, F., Almeciga-Diaz, C. J., Dominguez, M. C., & Barrera, L. A. (2008). [Construction of an adenoassociated, viral derived, expression vector to correct the genetic defect in Morquio A disease]. *Biomedica*, 28(3), 448-459.
- [7] Seregin, S., & Amalfitano, A. (2011). Gene therapy for lysosomal storage diseases: progress, challenges and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 17(24), 2558-2574.
- [8] Liting Song (2011). Gene Therapy of Some Genetic Diseases by Transferring Normal Human Genomic DNA into Somatic Cells and Stem Cells from Patients, *Non-Viral Gene Therapy*, Prof. Xubo Yuan (Ed.), ISBN: 978-953-307-538-9, InTech, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/non-viral-gene-therapy/gene-therapy-of-some-genetic-diseases-by-transferring-normal-human-genomic-dna-into-somatic-cells-an>
- [9] Qiana L. Matthews, Linlin Gu, Alexandre Krendelchtchikov and Zan C. Li (2013). *Viral Vectors for Vaccine Development, Novel Gene Therapy Approaches*, Prof. Ming Wei (Ed.), ISBN: 978-953-51-0966-2, InTech, DOI: 10.5772/54700. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/novel-gene-therapy-approaches/viral-vectors-for-vaccine-development>
- [10] Ferry, N., Pichard, V., Sébastien Bony, D., & Nguyen, T. (2011). Retroviral vector-mediated gene therapy for metabolic diseases: an update. *Current Pharmaceutical Design*, 17(24), 2516-2527.

- [11] Jacobs, F., & Wang, L. (2011). Adeno-associated viral vectors for correction of inborn errors of metabolism: progressing towards clinical application. *Current Pharmaceutical Design*, 17(24), 2500-2515.
- [12] Herrera, M.J. (2012). Uso de vectores lentivirales para mediar la transfección del gen de la enzima N-ACETIL-GALACTOSAMINA -6-SULFATO-SULFATASA en células en cultivo. Carrera Microbióloga industrial.
- [13] Barbosa, H. (2012). Efecto de la coexpresión de N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA y del factor activador de sulfatasa (sumf1), transducidos mediante vectores lentivirales sobre cultivos celulares. Carrera de Biología.
- [14] Espejo, A., Malaver, L., Rodríguez, A., Cuaspa, R., Almeciga-Díaz, C., & Barrera, L. (2010). Recent Patents in Diagnosis and Treatment for Inborn Errors of Metabolism. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, (4), 111-130.
- [15] Klein, A. D., & Futerman, A. H. (2013). Lysosomal storage disorders: old diseases, present and future challenges. *Pediatr Endocrinol Rev*, 11 Suppl 1, 59-63
- [16] Rivera-Colon, Y., Schutsky, E. K., Kita, A. Z., & Garman, S. C. (2012). The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A. *J Mol Biol*, 423(5), 736-751.
- [17] Tomatsu, S., Yasuda, E., Patel, P., Ruhnke, K., Shimada, T., Mackenzie, W., Mason, R., Thacker, M., Theroux, M., Montañó, A., Alméciga-Díaz, C., Barrera, L., Chinen, Y., Sly, W., Rowan, D., Suzuki, y., & Orii, T. (2014). Orphan Drug Therapy in the treatment of Lysosomal Storage Disorders. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 11(3), 1-11
- [18] Dvorak-Ewell, M., Wendt, D., Hague, C., Christianson, T., Koppaka, V., Crippen, D., Vellard, M. (2010). Enzyme replacement in a human model of mucopolysaccharidosis IVA in vitro and its biodistribution in the cartilage of wild type mice. *PLoS One*, 5(8), e12194.
- [19] Rodríguez, A., Espejo, A. J., Hernández, A., Velasquez, O. L., Lizaraso, L. M., Córdoba, H. A., Barrera, L. A. (2010). Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Escherichia coli* BL21. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37(11), 1193-1201.
- [20] Alexander, I. E., Cunningham, S. C., Logan, G. J., & Christodoulou, J. (2008). Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease. *Gene Ther*, 15(11), 831-839.
- [21] Alméciga-Díaz, C., Rueda-Paramo, M., Espejo, A., Echeverri, O., Montañó, A., Tomatsu, S., & Barrera, L. (2009). Effect of elongation factor 1 $\alpha$  promoter and SUMF1 over in vitro expression of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Molecular Biology Reports*, 36(7), 1863-1870.
- [22] Matrai, J., Chuah, M. K., & VandenDriessche, T. (2010). Recent advances in lentiviral

- vector development and applications. *Mol Ther*, 18(3), 477-490.
- [23] Peterson, G. L. (1979). Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. *Analytical Biochemistry*, 100(2), 201-220.
- [24] van Diggelen, O. P., Zhao, H., Kleijer, W. J., Janse, H. C., Poorthuis, B. J. H. M., van Pelt, J., Galjaard, H. (1990). A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A (MPS IV A). *Clinica Chimica Acta*, 187(2), 131-139.
- [25] Shapira E, Blitzer M, Miller J, Afrik D. (1989). Biochemical genetics. A laboratory manual. Pag 32-33. Oxford University Press. New York.
- [26] Thermo Scientific. First Strand cDNA Synthesis Kit. <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/prod-info-k1621-k1622-revertaid-first-strand-cdna-synthesis-kit.pdf?redirect=true> Consultado el 16 de abril de 2014.
- [27] Lifetechnologies. Fast SYBR® Green Master Mix. [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_046776.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_046776.pdf). Consultado el 22 de abril de 2014.
- [28] BIORAD. Bio-Dot® SF Microfiltration Apparatus. <http://post.queensu.ca/~chinsang/lab-protocols/handbooks-and-manuals/biorad-dot-blot.pdf> consultado el 12 de marzo de 2014.
- [29] Fraldi, A., Biffi, A., Lombardi, A., Visigalli, I., Pepe, S., Settembre, C., Cosma, M. P. (2007). SUMF1 enhances sulfatase activities in vivo in five sulfatase deficiencies. *Biochem J*, 403(2), 305-312
- [30] Lifetechnologies. TRIzol® LS Reagent. [http://tools.lifetechnologies.com/Content/SFS/ProductNotes/F\\_071215\\_Trizol%20and%20Trizol%20LS.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/Content/SFS/ProductNotes/F_071215_Trizol%20and%20Trizol%20LS.pdf) consultado el 22 de mayo de 2014.
- [31] Mewis, J. L., Sun, X., Zuidhof, M. J., & Guan, L. L. (2014). Research note: methodology for high quality RNA extraction from poultry whole blood for further gene expression analysis. *Br Poult Sci*.
- [32] Brestovac, B., Wong, M. E., Costantino, P. S., & Groth, D. (2014). A rapid DNA extraction method suitable for human papillomavirus detection. *J Med Virol*, 86(4), 653-657
- [33] Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51(3), 187-200
- [34] Neufeld E, Muenzer J. The Mucopolysaccharidosis. In: Scriver, C., Beaudet, W Sly., Valle (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, vol. III. McGraw-Hill: New York. 3421-3452 pp



## ANEXOS

### 1. Prueba de contrastes ortogonales para HEK293

#### 1.1 Prueba de contrastes ortogonales para HEK293 transducida con vectores AAV

**Coefficientes de los contrastes**

Contraste	Tratamiento			
	Control	Galns 100	Galns 100 SUMF1 100	Galns 100 SUMF1 300
1	-3	1	1	1
2	0	-2	1	1
3	0	0	1	-1

**Pruebas para los contrastes**

		Contraste	Valor del contraste	Error típico	t	gl	Sig. (bilateral)
Respuesta	Asumiendo igualdad de varianzas	1	,0637	,02022	3,149	8	,014
		2	-,0623	,01429	-4,361	8	,002
		3	,0030	,00825	,364	8	,726
	No asumiendo igualdad de varianzas	1	,0637	,01584	4,019	4,746	,011
		2	-,0623	,01122	-5,556	3,198	,010
		3	,0030	,01098	,273	2,941	,803

#### 1.2 Prueba de contrastes ortogonales para HEK293 transducida con vectores lentivirales

**Coefficientes de los contrastes**

Contraste	tratamientos			
	control Hek	GALNS 1 MOI	GALNS 5 MOI	GALNS 1 MOI / SUMF1 3 MOI
1	-3	1	1	1
2	0	-2	1	1
3	0	0	1	-1

**Pruebas para los contrastes**

		contraste	Valor del contraste	Error típico	t	gl	Sig. (bilateral)
respuesta	Asumiendo igualdad de varianzas	1	,0895	,15902	,563	8	,589
		2	-,1887	,11244	-1,678	8	,132
		3	-,0423	,06492	-,651	8	,533
	No asumiendo igualdad de varianzas	1	,0895	,15008	,596	3,707	,585
		2	-,1887	,08165	-2,311	4,000	,082
		3	-,0423	,08165	-,518	4,000	,632

**2. Prueba de contrastes ortogonales para fibroblastos MPS IV A**

**2.1 Prueba de contrastes ortogonales para fibroblastos transducida con vectores AAV-  
controles MPS IV A sin tratar.**

**Coefficientes de los contrastes**

Contraste	tratamientos			
	control fibroblastos MPSIVA	GALNS 100 Microlitros	GALNS 100 Microlitros y SUMF1 100 microlitros	GALNS 100 microlitros SUMF1 300microlitros
1	-3	1	1	1
2	0	-2	1	1
3	0	0	1	-1

**Pruebas para los contrastes**

		Contraste	Valor del contraste	Error típico	t	gl	Sig. (bilateral)
respuestas	Asumiendo igualdad de varianzas	1	,0637	,02022	3,149	8	,014
		2	-,0623	,01429	-4,361	8	,002
		3	,0030	,00825	,364	8	,726
	No asumiendo igualdad de varianzas	1	,0637	,01584	4,019	4,746	,011
		2	-,0623	,01122	-5,556	3,198	,010
		3	,0030	,01098	,273	2,941	,803

**2.2 prueba de contrastes ortogonales para fibroblastos transducida con vectores AAV - controles fibroblastos normales.**

**Coefficientes de los contrastes**

Contraste	tratamientos			
	control fibroblasto normal	GALNS 100 Microlitros	GALNS 100 Microlitros y SUMF1 100 microlitros	GALNS 100 microlitros SUMF1 300microlitros
1	-3	1	1	1
2	0	-2	1	1
3	0	0	1	-1

**Pruebas para los contrastes**

	Contraste	Valor del contraste	Error típico	t	gl	Sig. (bilateral)
respuestas de varianzas	Asumiendo igualdad 1	-,2153	,01912	-11,261	8	,000
	2	-,0623	,01352	-4,610	8	,002
	3	,0030	,00781	,384	8	,711
No asumiendo igualdad de varianzas	1	-,2153	,01104	-19,504	3,006	,000
	2	-,0623	,01122	-5,556	3,198	,010
	3	,0030	,01098	,273	2,941	,803

**2.3 prueba de contrastes ortogonales para fibroblastos transducida con vectores lentivirales - controles fibroblastos normales.**

**Coefficientes de los contrastes**

Contraste	tratamientos			
	control fibroblastos MPS IVA	GALNS 1 MOI	GALNS 5 MOI	GALNS 1MOI/ SUMF1 3MOI
1	-3	1	1	1
2	0	-2	1	1
3	0	0	1	-1

**Pruebas para los contrastes**

		Contraste	Valor del contraste	Error típico	t	gl	Sig. (bilateral)
respuesta	Asumiendo igualdad de varianzas	1	-,7347	,11743	-6,257	8	,000
		2	,0409	,08303	,493	8	,635
		3	-,0232	,04794	-,484	8	,642
No asumiendo igualdad de varianzas		1	-,7347	,06780	-10,837	4,292	,000
		2	,0409	,07145	,573	5,073	,591
		3	-,0232	,06653	-,348	3,993	,745

**3. Prueba de contrastes ortogonales para hexosaminidasa específica – controles MPS IV A sin tratar**

**Coefficientes de los contrastes**

Contraste	tratamientos			
	control fibroblasto MPS IVA	GALNS 1MOI	GALNS 5 MOI	GALNS 1 MOI / SUMF1 3 MOI
1	-3	1	1	1
2	0	-2	1	1
3	0	0	1	-1

**Pruebas para los contrastes**

		Contraste	Valor del contraste	Error típico	t	gl	Sig. (bilateral)
respuestas	Asumiendo igualdad de varianzas	1	230,4500	116,3287 9	1,981	8	,083
		2	-111,9000	82,25688	-1,360	8	,211
		3	3,0133	47,49103	,063	8	,951
No asumiendo igualdad de varianzas		1	230,4500	68,93294	3,343	4,565	,024
		2	-111,9000	114,6482 6	-,976	2,561	,412
		3	3,0133	39,91025	,076	3,430	,944

#### 4. Prueba de Dunnett

##### 4.1 Prueba de Dunnett para HEK293 transducida con vectores AAV

###### Comparaciones múltiples

Respuesta de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup>

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Galns 100	Control	,04200 <sup>*</sup>	,00825	,002	,0182	,0658
Galns 100 SUMF1 100	Control	,01233	,00825	,365	-,0114	,0361
Galns 100 SUMF1 300	Control	,00933	,00825	,563	-,0144	,0331

##### 4.2 Prueba de Dunnett para hek293 transducida con vectores lentivirales

###### Comparaciones múltiples

respuesta de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup>

(I) tratamientos	(J) tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GALNS 1 MOI	control Hek	,09273	,06492	,397	-,0942	,2797
GALNS 5 MOI	control Hek	-,02274	,06492	,970	-,2097	,1642
GALNS 1 MOI / SUMF1 3 MOI	control Hek	,01953	,06492	,981	-,1674	,2065

### 4.3 Prueba de Dunnett para fibroblastos MPS IV A transducida con vectores AAV- Controles MPS IV A sin tratar

#### comparaciones múltiples

respuestast de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup>

(I) tratamientos	(J) tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GALNS 100 Microlitros	control fibroblastos MPSIVA	,04200*	,00825	,002	,0182	,0658
GALNS 100 Microlitros y SUMF1 100 microlitros	control fibroblastos MPSIVA	,01233	,00825	,365	-,0114	,0361
GALNS 100 microlitros SUMF1 300microlitros	control fibroblastos MPSIVA	,00933	,00825	,563	-,0144	,0331

## 5. Prueba de Bonferroni

### 5.1 Prueba de Bonferroni para fibroblastos transducida con vectores lentivirales -controles fibroblastos MPS IV A sin tratar.

#### Comparaciones múltiples

Bonferroni

(I) tratamientos	(J) tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 99%	
					Límite inferior	Límite superior
control	GALNS 1 MOI	,00333	,00827	1,000	-,0350	,0417
fibroblastos MPS IVA	GALNS 5 MOI	-,00167	,00827	1,000	-,0400	,0367
	GALNS 1MOI/ SUMF1 3MOI	-,00567	,00827	1,000	-,0440	,0327
GALNS 1 MOI	control	-,00333	,00827	1,000	-,0417	,0350
	fibroblastos MPS IVA					
	GALNS 5 MOI	-,00500	,00827	1,000	-,0434	,0334
	GALNS 1MOI/ SUMF1 3MOI	-,00900	,00827	1,000	-,0474	,0294
GALNS 5 MOI	control	,00167	,00827	1,000	-,0367	,0400
	fibroblastos MPS IVA					
	GALNS 1 MOI	,00500	,00827	1,000	-,0334	,0434
	GALNS 1MOI/ SUMF1 3MOI	-,00400	,00827	1,000	-,0424	,0344
GALNS 1MOI/ SUMF1 3MOI	control	,00567	,00827	1,000	-,0327	,0440
	fibroblastos MPS IVA					
	GALNS 1 MOI	,00900	,00827	1,000	-,0294	,0474
	GALNS 5 MOI	,00400	,00827	1,000	-,0344	,0424

## 5.2 Prueba de Bonferroni para hexosaminidasa volumetrica – controles MPS IV A sin tratar

### Comparaciones múltiples

(I) tramientos	(J) tramientos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
control MPS IVA	GALNS 1 MOI	-3,15172	1,95323	,872	-9,9468	3,6433
	GALNS 5 MOI	-3,84250	1,95323	,508	-10,6376	2,9526
	GALNS 1 MOI / SUMF1 3 MOI	-2,00365	1,95323	1,000	-8,7987	4,7914
GALNS 1 MOI	control MPS IVA	3,15172	1,95323	,872	-3,6433	9,9468
	GALNS 5 MOI	-,69079	1,95323	1,000	-7,4858	6,1043
	GALNS 1 MOI / SUMF1 3 MOI	1,14807	1,95323	1,000	-5,6470	7,9431
GALNS 5 MOI	control MPS IVA	3,84250	1,95323	,508	-2,9526	10,6376
	GALNS 1 MOI	,69079	1,95323	1,000	-6,1043	7,4858
	GALNS 1 MOI / SUMF1 3 MOI	1,83885	1,95323	1,000	-4,9562	8,6339
GALNS 1 MOI / SUMF1 3 MOI	control MPS IVA	2,00365	1,95323	1,000	-4,7914	8,7987
	GALNS 1 MOI	-1,14807	1,95323	1,000	-7,9431	5,6470
	GALNS 5 MOI	-1,83885	1,95323	1,000	-8,6339	4,9562