

Uso de vectores derivados de virus adenoasociados para el tratamiento de la enfermedad de Morquio A

CARLOS JAVIER ALMÉCIGA-DÍAZ¹
MARÍA ANDREA RUEDA-PÁRAMO¹
OLGA YANETH ECHEVERRI¹
ADRIANA MARÍA MONTAÑO²
SHUNJI TOMATSU²
LUIS ALEJANDRO BARRERA¹

Resumen

En el desarrollo de una estrategia de terapia génica para la mucopolisacaridosis IV A (enfermedad de Morquio A), en el presente trabajo se evaluó la capacidad de un vector adenoasociado (AAV) para expresar el gen de la enzima sulfatasa N-acetilgalactosamina-6-sulfato (GALNS, *N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase*) en células HEK293, fibroblastos humanos con mucopolisacaridosis IV A y condrocitos de ratón con mucopolisacaridosis IV A.

En el lisado celular, la actividad de la GALNS se incrementó entre 5 y 24 veces los valores observados en las células sin transfectar. La coexpresión con el gen del factor activador de sulfatasas 1 (SUMF1, *sulfatase modifying factor 1*) permitió un incremento en la actividad de la GALNS en el lisado celular de hasta 4,5 veces los valores observados en las células cotransfectadas con AAV-GALNS. La actividad de la GALNS en el medio de cultivo sólo se detectó en células cotransfectadas con AAV-SUMF1.

Estos resultados constituyen evidencia valiosa sobre la posibilidad de realizar la corrección del defecto genético en la mucopolisacaridosis IV A empleando vectores AAV.

Palabras clave: Morquio A, terapia génica, GALNS, SUMF1 y virus adenoasociados.

1 Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

2 Department of Pediatrics, School of Medicine, Saint Louis University, MO, USA.

Este trabajo fue realizado en la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá) y en Saint Louis University (MO, USA).

Recibido: 26-01-2009

Revisado: 24-04-2009

Aceptado: 25-06-2009

Title

Adenoassociated virus-derived vectors for the treatment of Morquio A disease

Abstract

Toward the development of a gene therapy strategy for the mucopolysaccharidosis IV A (MPS IV A, Morquio A), in this work we evaluated the capability of an AAV vector to express the N-acetilgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene in HEK293 cells, human mucopolysaccharidosis IV A fibroblasts and murine MPS IV A chondrocytes. GALNS activity in lysated cells was increased between 5 and 24 folds compared to non-transfected cells. Also, the effect of coexpression with the sulfatase modifying factor 1 (SUMF1) was evaluated.

GALNS activity was increased up to 4.5 folds in lysated cells compared to those values observed in AAV-GALNS transduced cells. Noteworthy, enzyme activity was only detected in culture media when cells were cotransfected with AAV-GALNS and AAV-SUMF1.

These results represent a valuable step in the development of a gene therapy strategy for mucopolysaccharidosis IV A using AAV vectors.

Key words: Morquio A, gene therapy, GALNS, SUMF1 and adenoassociated virus.

Introducción

La mucopolisacaridosis IV A (MPS I VA, enfermedad de Morquio A, OMIM #253000) es una enfermedad de depósito lisosomal de tipo autosómica recesiva, producida por la deficiencia de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS, EC 3.1.6.4), la cual hidroliza el grupo 6-sulfato de las unidades N-acetilgalactosamina-6-sulfato del condroitín 6 sulfato (C6S) y

de las unidades D-galactosa-6-sulfato del queratán sulfato[1, 2].

La mucopolisacaridosis IV A es una enfermedad rara, con una incidencia promedio de 1:250.000 (www.morquio.com, [3]). A pesar de que no se dispone de información sobre su incidencia en Colombia, se ha documentado el hallazgo de esculturas precolombinas con claros rasgos de individuos afectados con la mucopolisacaridosis IV A[4] y, en la experiencia del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, es la más diagnosticada hasta el momento en el país [5, 6].

La mucopolisacaridosis IV A es una enfermedad caracterizada por la acumulación lisosomal de los glucosaminoglicanos queratán sulfato y condroitín 6 sulfato, principalmente en hueso y córnea[3]. El fenotipo de la enfermedad varía desde una forma grave, caracterizada por una importante displasia esquelética, estatura corta, facies tosca, hipoplasia de la odontoides, *pectus carinatum*, cifoescoliosis, *genu valgum*, laxitud de articulaciones, pérdida del oído, opacidad corneal, enfermedad de válvulas cardíacas y hepatoesplenomegalia leve, hasta formas medias o atenuadas, con menor compromiso óseo. Sin embargo, a diferencia de otras mucopolisacaridosis los pacientes con la MPS IV A no presentan compromiso de la esfera mental[7, 8, 2, 3].

En la actualidad, no se dispone de una terapia efectiva para el tratamiento de mucopolisacaridosis IV A y sólo se han empleado medidas paliativas e intervenciones quirúrgicas para tratar algunas manifestaciones[3]. Aunque el trasplante de médula ósea ha probado tener un gran impacto en las manifestaciones somáticas en diferentes mucopolisacaridosis, tiene un efecto limitado sobre las anomalías cardíacas, visuales y esqueléticas[9, 10]. La terapia de remplazo enzimático para la mucopolisacaridosis IV A se encuentra en fase preclínica, con resultados prometedores en el modelo murino de la enfermedad[11]. Sin embargo, los pacientes requerirían infusiones intravenosas semanales de la enzima recombinante, con costos anuales por paciente que superan los US\$ 300.000 y con posibles complicaciones inmunológicas debidas a la administración de grandes cantidades de enzima[12].

La terapia génica es una alternativa para el tratamiento de las enfermedades de depósito lisosomal, por las siguientes razones:

- (a) no se requiere una estricta regulación de la expresión del gen[13];
- (b) los niveles cercanos al 10% de los valores normales permiten pasar de un fenotipo grave a uno atenuado o intermedio[14];
- (c) es posible la corrección de células no transfectadas mediante el mecanismo de corrección cruzada por captura de la enzima por los receptores de manosa-6-fosfato[15, 16];
- (d) los ensayos preclínicos en diferentes modelos animales (ratón, rata, perro y gato) han permitido niveles enzimáticos terapéuticos hasta por 1,5 años en ratón y 7 años en perros, con importantes correcciones bioquímicas y clínicas, tras una única administración[17-20], y
- (e) en las enfermedades producidas por la deficiencia de una sulfatasa (como MPS II, MPS III A, MPS III D, MPS IV A y MPS VI), la coexpresión con el factor activador de sulfatasas (SUMF1), involucrado en la activación del sitio activo de todas las sulfatasas, ha permitido incrementos entre 2 y 3 veces en los valores de actividad de diferentes sulfatasas recombinantes, con un notable efecto en la distribución de la enzima[21], la proporción de la enzima secretada y las manifestaciones bioquímicas y clínicas de la enfermedad[22, 23].

Entre los diferentes vectores virales y no virales empleados en terapia génica para enfermedades de depósito lisosomal, los vectores derivados de virus adenoasociados (AAV) han mostrado importantes beneficios clínicos

y expresiones prolongadas en modelos animales de la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Pompe, la leucodistrofia metacromática, la enfermedad de Niemann-Pick A y las mucopolisacaridosis I, II, III A, III B, IV y VII (revisado en[24, 25].

Los vectores virales adenoasociados son virus no patógenos con un ADN lineal de cadena sencilla de 4,7 kb, el cual requiere de la presencia de un virus ayudador, tipo adenovirus o herpes simplex, para su replicación[26]. La administración intravenosa de vectores AAV en modelos animales de enfermedades de depósito lisosomal, ha llevado a incrementos en la actividad enzimática de hasta 16 veces los valores normales en sangre, hígado, bazo, riñón y músculo, con reducción de las acumulaciones de glucosaminoglicanos y restauración de la arquitectura del tejido[27, 19, 28, 16]. Para la mucopolisacaridosis IV A no se han publicado experimentos de terapia génica *in vivo* y sólo existe el reporte de la transfección de diferentes líneas celulares empleando vectores retrovirales, con los que se logró un incremento en la actividad enzimática entre 5 y 50 veces los valores normales[29].

En el presente trabajo se evaluó el perfil de expresión del vector AAV-GALNS, el cual porta el gen humano de la GALNS bajo el control del

intensificador temprano y promotor del citomegalovirus (CMV), en células HEK293 y en fibroblastos de humanos y condrocitos de ratón, ambos con mucopolisacaridosis IV A. Además, se evaluó el efecto de la coexpresión con el gen SUMF1, mediante la coadministración de AAV-GALNS con el vector AAV-SUMF1. Estos resultados muestran el potencial de los vectores AAV y de la coexpresión con SUMF1, para la corrección del defecto en la mucopolisacaridosis IV A.

Materiales y métodos

Construcción de los plásmidos. El plásmido pAAV-CMV-GALNS, previamente construido[30], porta el ADNc de la GALNS humana bajo el control del intensificador temprano y el promotor del citomegalovirus, un intrón sintético, la señal de entrada al ribosoma IRES, que permite la transducción de dos secuencias en un mismo ARNm, el gen de resistencia a neomicina y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, flanqueados por los ITR del serotipo AAV2. El plásmido pAAV-CMV-SUMF1 se construyó reemplazando el ADNc de GALNS en pAAV-CMV-GALNS, por el fragmento EcoRI de 1,2 kb, correspondiente al gen de SUMF1 humano, obtenido mediante digestión del plásmido pCXN-SUMF1. Todos los procedimientos moleculares se llevaron a cabo empleando protocolos estándar[31].

Producción de los vectores. Las partículas virales recombinantes de virus adenoasociados se produjeron por el método de triple transfección libre de adenovirus, desarrollado por Xiao *et al.*[32]. En este método, las células HEK293 son cotransfectadas con: (a) el plásmido que porta el gen de interés flanqueado por los ITR (pAAV-CMV-GALNS o pAAV-CMV-SUMF1), (b) el plásmido de empaquetamiento pXX2, el cual porta las secuencias de los genes *Rep* y *Cap* de AAV2, y (c) el plásmido ayudador pXX6-80 que porta las secuencias adenovirales necesarias para la replicación y el empaquetamiento del genoma viral.

Las células HEK293 se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagles MEM (Gibco), con suplemento de penicilina-estreptomicina (Gibco) 100 U/ml-100 µg/ml, glutamina (GIBCO) 2 mM y suero bovino fetal (SFB - Invitrogen) al 15%, en una atmósfera al 5% de CO₂ a 37°C. Cuarenta y ocho horas antes de la transfección, se sembraron 1x10⁶ células en placas cultivo de 10 cm con 15 ml de medio crecimiento sin antibióticos. Las células se incubaron durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂, tiempo en el que se debe lograr una confluencia entre 80% y 90%.

Dos horas antes de la transfección, el medio de cultivo se cambió por 15 ml de medio de crecimiento fresco, li-

bre de antibióticos y suero fetal bovino. La transfección se realizó empleando la mezcla de liposomas catiónicos Lipofectamine 2000® (Invitrogen), de la siguiente manera: en un tubo estéril de 15 ml se mezclaron los plásmidos pAAV-CMV-GALNS o pAAV-CMV-SUMF1 con los plásmidos pXX2 y pXX6-80, en una relación molar 1:1:1 que corresponde a una relación 5:5:15 en términos de µg de ADN, para un total de 25 µg de ADN por cada caja de cultivo. Todos los ADN de los plásmidos utilizados se purificaron empleando el kit QUIAEX-Maxi-prep (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante. Como control de cotransfección, producción y transfección, se produjeron partículas virales nativas, mediante cotransfección con el plásmido pSUB201, el cual contiene el genoma del virus adenoasociado serotipo 2.

La mezcla de ADN del plásmido (25 µg) se diluyó en 1,5 ml de medio de cultivo libre de suero Opti-MEM®I (Invitrogen) y se mezcló suavemente. En otro tubo, se diluyeron 60 µl de Lipofectamine 2000® con 1,5 ml de Opti-MEM®I. La mezcla se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se mezclaron las dos soluciones y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir que los liposomas incorporaran el ADN. Pasados los 20 minutos, la solución ADN-Lipofectamine 2000® se adicio-

nó a los cultivos de células HEK293, mezclando suavemente por rotación para permitir que los complejos se distribuyeran uniformemente en la caja de cultivo. Las células transfectadas se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Doce horas después de la transfección, el medio se reemplazó con medio de crecimiento MEM fresco y se continuó con la incubación en las mismas condiciones descritas durante 48 horas, momento en el que las células se tripsinizaron y resuspendieron en 15 ml de buffer de lisis (0,15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,5). Las células se lisaron mediante tres ciclos de congelación y descongelación, alternando los tubos entre un baño de hielo seco con etanol y un baño serológico a 37°C. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 3.700 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante representó la solución viral primaria, la cual se almacenó a -80°C para su posterior purificación y cuantificación.

Purificación y cuantificación de los vectores recombinates AAV. Las partículas virales se purificaron empleando el método desarrollado por Zolotukhin *et al.*[33]. Este método emplea un gradiente discontinuo no iónico de iodixanol (OptiPrep-Sigma) y posterior ultrafiltración por una membrana de 100 kDa para concentrar la muestra y remover el iodixanol.

El gradiente se construyó de la siguiente manera: en tubos Ultra-Clear de 25x89 mm (Beckman), se adicionaron lentamente 9 ml de iodixanol al 15% y NaCl 1M en solución tampón PBS-MK (Na₂HPO₄ 1,09 g, NaH₂PO₄ 0,32 g, NaCl 9 g por litro a pH 7,2, MgCl₂ 1 mM, KCl 2,5 mM), 6 ml de iodixanol al 25% en PBS-MK con rojo fenol (15 µl de una solución al 0,5%), 5 ml de iodixanol al 40% en PBS-MK y 5 ml de iodixanol al 60% (Optiprep, es una solución acuosa estéril de iodixanol al 60%). Finalmente, se agregaron lentamente 15 ml de la solución viral primaria clarificada. El gradiente se centrifugó a 25.000 rpm durante 16 horas a 18°C. Trascurrido este tiempo, se tomaron, aproximadamente, 2,5 ml de la fase del 60% y 2,5 ml de la fase del 40%, mediante punción del tubo con una aguja calibre 23G.

La fracción de iodixanol se concentró mediante ultrafiltración por membrana de 100 kDa. Para tal fin, 2 ml de muestra fueron cargados en un Centricon® 100K (Millipore) y centrifugados a 1.000 g por 30 minutos y 4°C, y se descartó la fracción que pasaba a través de la membrana. Este paso se repitió hasta que la totalidad de la muestra (aproximadamente, 5 ml) fue centrifugada. Finalmente, se hicieron dos lavados con 2 ml de NaCl 0,9% para remover el iodixanol, el cual interfiere con el proceso de cuantificación.

Las soluciones virales se cuantificaron por el método espectrofotométrico desarrollado por Sommer *et al.* (34). Este método se basa en la medición de absorbancia a 260 y 280 nm de una solución viral purificada. El cálculo de los genomas virales por ml (vg/ml) tiene en cuenta, tanto los coeficientes de extinción de las proteínas de la cápside del serotipo AAV2 (VP1, VP2 y VP3), como el del ADN viral, que depende del peso molecular del genoma del vector. Este método permite la cuantificación rápida, económica y reproducible de soluciones virales purificadas, con una correlación de 98% con otros métodos de cuantificación, como ELISA y *dot-blot* (34). Para la cuantificación, se incubaron 100 µl de la solución viral purificada por 10 minutos a 75°C con 0,5 µl de SDS al 20%, y se midió la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. Como blanco se empleó una solución de NaCl al 0,9%, la cual fue tratada de igual forma que las muestras.

La concentración de genomas virales (gv/ml) se calculó empleando la ecuación 1:

$$gv/ml = \frac{4,47 \times 10^{19} (A_{260} - 0,59 A_{280})}{MW_{DNA}} \quad (1)$$

donde, MW_{ADN} corresponde al peso molecular de la secuencia flanqueada por los ITR para cada vector, basado en el peso molecular de cada

nucleótido: A=312,2 Da, C=288,2 Da, G=328,2 Da y T=303,2 Da. Igualmente, el cálculo de la relación de cápsides por genoma viral (cp/gv) se calculó con la ecuación 2:

$$cp/gv = MW_{DNA} \times \frac{1,76 \times 10^{-6} (1,80 - A_{260}/A_{280})}{A_{260}/A_{280} - 0,59} \quad (2)$$

La relación cp/gv es igual a 1, cuando el 100% de las partículas contienen ADN y es >50 cuando sólo hay presentes partículas virales vacías.

Transfección de células HEK293.

Veinticuatro horas antes de la transfección, se sembraron 1×10^5 células HEK293 por pozo en placas de 24 pozos, cultivadas en 1 ml de medio esencial mínimo de Eagle DMEM con suplemento de SFB al 15% y antibióticos a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió 2 horas antes de la transfección por medio fresco y 1×10^{10} gv (1×10^5 gv/célula) de los vectores AAV-GALNS y AAV-SUMF1 fueron adicionados a cada pozo. Al cabo de dos días, el medio se reemplazó por uno con suplemento de genitcina (Gibco) en una concentración de 400 µg/ml. Como control se emplearon células HEK293 sin transfectar. Todas las transfecciones se realizaron por triplicado.

A los 2, 4, 8 y 10 días después de la transfección, a las células se tripsinizaron y resuspendieron en 200 µl de

solución de lisis (acetato de sodio 25 mM, β -glicerolfosfato 1 mM, pH 5,5, tritón X-100 1%), y lisadas mediante tres ciclos de congelación/descongelación. La solución se clarificó por centrifugación a 2.500 g por 5 minutos y se almacenó a -80°C para posteriores análisis. El medio de cultivo fue recolectado a los 2, 4, 8 y 10 días después de la transfección. La solución se clarificó por centrifugación a 2.500 g por 5 minutos y se almacenó a -80°C para posteriores análisis.

Para la cotransfección con CMV-SUMF1, $1,5 \times 10^5$ células/pozo fueron sembradas en placas de 12 pozos, 24 horas antes de la transfección. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco dos horas antes y las células fueron transfectadas con $1,5 \times 10^{10}$ gv en una relación 1:1 y 1:2 GALNS:SUMF1. Al cabo de 48 horas, el medio se cambió por uno que contenía genitocina y, al cuarto día después de la transfección, las células tripsinizaron. El lisado celular y el medio de cultivo se procesaron como se describió anteriormente.

Transfección de fibroblastos de mucopolisacaridosis IV A. Se obtuvieron fibroblastos de piel provenientes de un paciente con síndrome de Morquio A (MO18), con la mutación I113F/R361G (fenotipo grave), del banco de células del *Pediatric Research Institute de Saint Louis University*. Los fibroblastos MO18 se

cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle DMEM con suplemento de SFB al 15%, prolina y antibióticos. Veinticuatro horas antes de la transfección, se sembraron $1,5 \times 10^5$ células/pozo en placas de 12 pozos. El medio se cambió 2 horas antes de la transfección y $1,5 \times 10^{10}$ gv (1×10^5 gv/célula) fueron adicionados. Al cabo de dos días, el medio se reemplazó por uno con suplemento de genitocina (Gibco) en una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$. Como control se emplearon fibroblastos normales y MO18 sin transfectar. A las células se agregó tripsinizaron a los 4 días después de la transfección y el lisado celular y el medio de cultivo se obtuvieron como se describió para las células HEK293. La cotransfección con CMV-SUMF1 se hizo como se describió previamente para las células HEK293, con $1,5 \times 10^{10}$ gv en una relación 1:1 y 1:2 GALNS:SUMF1. Todas las transfecciones se hicieron por triplicado.

Aislamiento y transfección de condrocitos de ratón. Los condrocitos de ratón se obtuvieron a partir del apéndice xifoides de ratones *knock-out* C57BL/6J silvestres y con mucopolisacaridosis IV A (*Galns^{-/-}*), como describen Tomatsu *et al.*[35]. El tejido se tomó bajo condiciones estériles y lavado con solución de Hanks (Sigma-Aldrich). Los tejidos se incubaron en medio de crecimiento de condrocitos (CGM, Cambrex Bio Science) con 0,4% de pronasa durante 1 hora a 37°C

y, posteriormente, con 0,05% de colagenasa bacteriana durante 18 horas a 37°C. Las células resultantes (condrocitos) se filtraron a través de una membrana de nailon de 80 µm (Millipore) en un tubo de centrifuga de 50 ml con medio CGM y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 minutos. Luego de cuatro lavados con medio libre de colagenasa, los condrocitos se cultivaron en placas de 24 pozos con 2 ml de medio de crecimiento. Luego de alcanzar una confluencia de 60% a 70%, los condrocitos *Galns*^{-/-} fueron transfectados con 1x10¹⁰ gv de AAV-GALNS, en ausencia o presencia de AAV-SUMF1 en relación 1:2. El medio se reemplazó 24 horas después de la transfección. Cuatro días después de la transfección, se recolectó el medio y las células se lavaron tres veces con NaCl 0,9% y se resuspendieron en 100 µl de deoxicolato de sodio al 1%. Se emplearon condrocitos de ratones *Galns*^{-/-} y silvestres sin transfectar como control. Todas las transfecciones se hicieron por triplicado.

Cuantificación de la proteína por el método de MicroLowry. La proteína en los lisados celulares se cuantificó por el método de MicroLowry (36). Inmediatamente antes del análisis, las soluciones A (Na₂CO₃ 20 g/L, NaOH 16 g/L, tartrato de sodio 0,8 g/L) y B (CuSO₄·5H₂O 5 g/L) se mezclaron en una proporción 50:1, para obtener la solución C. Se adicionó un ml de so-

lución C a tubos de borosilicato de 12x75 mm (Fischer) y se mezcló con 100 µl de solución estándar de albumina sérica bovina (BSA), fracción V, o 100 µl de una dilución 1:10 del lisado celular. La mezcla fue homogeneizada por vórtex e incubada 10 minutos a 37°C en baño de María. Trascorrida la incubación, se adicionaron 100 µl de una dilución 1:1 en agua destilada de reactivo Folin & Ciocolten's Phenol 2N (Sigma-Aldrich). La mezcla se homogeneizó rápidamente por vórtex y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la absorbancia se midió a 660 nm. La curva de BSA empleada fue de 4 a 40 µg de BSA, considerándose adecuada para la cuantificación cuando el r² era superior a 0,99. Cada muestra se cuantificó por duplicado.

Determinación de la actividad enzimática. La actividad enzimática se determinó por el método descrito por van Diggelen *et al.* (37). Este método emplea la acción secuencial de dos enzimas: inicialmente, GALNS remueve el grupo sulfato del sustrato 4-metil-umberiferil β-D-galactopiranosido-6-sulfato y, finalmente, el fluorógeno 4-metilumbeliferona es liberado por la enzima β-galactosidasa. La cantidad de 4-metilumbeliferona liberada es directamente proporcional a la cantidad de GALNS presente en la muestra analizada.

Para la reacción, en tubo de borosilicato 10x75 mm (Fischer), se mezclaron 2 µl de muestra con 9 µl de sustrato 4-metil-umberiferil β-D-galactopiranosido-6-sulfato (Toronto Research Chemicals) 22 mM en solución tampón NaCl 0,1M, acetato de sodio 0,1M, pH 4,3. La mezcla fue homogeneizada por vórtex e incubada 18 horas a 37°C. Como blanco de reacción, se emplearon 2 µl de agua destilada. Transcurrida la incubación, se adicionó 1 µl de una solución 10 mg/ml de β-galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (SIGMA), homogeneizando por vórtex e incubando por 30 minutos 37°C. Finalmente, se agregaron a la mezcla 1,9 ml de solución de parada (glicina, 24 g/L; Na₂CO₃, 21,2 g/L; NaOH, 7,5 g/L, pH10). La fluorescencia de la muestra se determinó en un fluorómetro Turner Biosystems modelo 9200-000 a $1_{ex} 366/l_{em} 450$. Las unidades de enzima (nm de 4-metilumbeliferona liberada por hora por ml) se calcularon empleando la ecuación 3:

$$U = \frac{10 \text{ nm} \times 1.000 \text{ } \mu\text{L}}{2 \mu\text{L} \times 1 \text{ mL} \times \text{tiempo de incubación (h)}} \quad (3)$$

Para los lisados celulares, las unidades de enzima se dividieron por los miligramos de proteína en el lisado (U/mg).

PCR y RT-PCR. Para el análisis semicuantitativo por PCR (semiQ-

PCR) del genoma y ARNm de los vectores, se sembraron 2×10^5 células HEK293 por pozo en placas de 6 pozos, como se describió previamente. Las células fueron transfectadas con 2×10^{10} gv de CMV-GALNS y tripsinizaron a los 2, 4, 8 y 10 días después de la transfección. Se emplearon células HEK293 sin transfectar como control. El ADN genómico y el ARN total se extrajeron empleando el kit AllPrep DNA/RNA mini (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN y del ARN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y por cuantificación espectrofotométrica a 260/280 nm. Todas las transfecciones se hicieron por duplicado.

Para la identificación del ADN viral, se emplearon los cebadores TOMF23 y TOMF34R, los cuales son específicos para el ADNc de GALNS humano y amplifican un fragmento de 235 pb. Los sitios de unión para TOMF23 y TOMF34R en la secuencia genómica de GALNS, se encuentran en los exones 10 y 12, respectivamente, que teóricamente amplificarían un fragmento de 4,1 kb, pero, bajo las condiciones de la PCR, permiten amplificar específicamente el genoma viral. La amplificación se llevó a cabo a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y 72°C por 10 minutos. Los productos de la PCR se visualizaron en agarosa al 1,5%.

Para el análisis del ARNm viral, la primera cadena de ADN se sintetizó por RT-PCR con 500 ng de ARN total y un oligo-dT, empleando el kit SuperScript II First-Strand ADNc Synthesis System (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Del producto de reacción, se amplificaron 2 µl con TOMF23-TOMF34R y con cebadores para el gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), GADPHS 5-ACCACA GTCCATGCCATCAC-3 y GADPHR 5-TCCACCACCCTGTTG CTGTA-3, los cuales amplifican un fragmento de 452 pb, el que fue usado para la normalización de los resultados. La amplificación se llevó a cabo como se describió para el ADN viral. Los productos de la PCR se visualizaron en agarosa al 1,5% y la densidad de las bandas (intensidad/mm²) se midió empleando el programa Image J 1,38x (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, National Institutes of Health, USA). Los valores se reportaron como la relación de la densidad de la banda de GALNS Vs. la de GADPH.

Análisis estadísticos. Todos los resultados son reportados como la me-

dia ± desviación estándar. Para el análisis estadístico, las medias se compararon mediante la prueba t de Student para muestras independientes, empleando el programa SPSS 13.0 para Mac OS X. Una diferencia se consideró significativa con valores $p < 0,05$.

Resultados

El esquema de los vectores AAV-GALNS y AAV-SUMF1 se ilustra en la figura 1. El método de producción, purificación y cuantificación de los vectores recombinantes empleado en el presente trabajo permitió obtener aproximadamente 1 ml de solución viral purificada con títulos virales del orden de 10¹³ vg/ml (tabla 1), superiores a los reportados por Zolotukhin *et al.* (33) y Sommer *et al.*[34], los cuales estaban en el orden de 10¹¹ vg/ml.

Las relaciones cp/gv, las cuales son un indicativo del número de cápsides vacías presentes en la preparación viral, fueron menores a las reportadas por Sommer *et al.*[34].

Tabla 1
Cuantificación de los vectores recombinantes por método espectrofotométrico

Vector	Tamaño (pb)	Peso molecular (g/mol)	A_{260}/A_{280} Teórico	A_{260}	A_{260}/A_{280} Observado	vg/ml	cp/vg	Rendimiento (%)
AAV2	4.677	1,44 x10 ⁶	1,4578	2,868	0,928	3,24 x10 ¹³	6,53	63,7%
AAV-GALNS	4.937	1,52 x10 ⁶	1,4707	2,884	1,118	4,01 x10 ¹³	3,45	76,0%
AAV-SUMF1	4.467	1,37 x10 ⁶	1,4464	2,535	1,140	3,97 x10 ¹³	2,90	78,8%

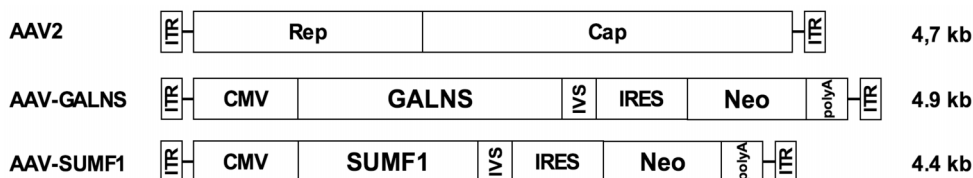


Figura 1. Esquema del virus AAV2 (nativo) y de los vectores virales recombinantes AAV-GALNS y AAV-SUMF1. CMV: intensificador temprano y promotor del citomegalovirus humano; GALNS: ADNc de GALNS humana; SUMF1: ADNc de SUMF1 humana; IVS: intrón sintético; IRES: sitio interno atenuado de entrada al ribosoma del virus de la encefalomiocarditis; Neo: secuencia codificante de neomicina fosfotransferasa; PolyA: fragmento codificante de la señal de poli-A de la hormona de crecimiento bovina; Amp: gen de resistencia a ampicilina (β -lactamasa).

El rendimiento del proceso de producción se calculó comparando la relación A_{260}/A_{280} obtenida experimentalmente, contra la calculada para una preparación con el 100% de partículas que contenían genoma, en donde la relación cp/gv es igual a 1[34]. Empleando la ecuación 3, se calculó el valor de A_{260}/A_{280} para una preparación sin partículas vacías, el cual corresponde a 1,4578; 1,4707 y 1,4464 para las soluciones virales AAV2, AAV-GALNS y AAV-SUMF1, respectivamente.

Como se observa en la tabla 1, los rendimientos del proceso de empaquetamiento se encuentran entre 63% y 79%, valores más altos que los reportados por Sommer *et al.*[34], quienes obtuvieron rendimientos alrededor de 50%.

Modificaciones, como el uso de liposomas para la cotransfección y la remoción del rojo de fenol en el paso

de iodizanol 60%, pueden haber jugado un papel importante en estos rendimientos. No se observó ninguna relación entre el tamaño del vector y el título viral o el rendimiento, aunque los títulos y rendimientos fueron más elevados en los vectores recombinantes (AAV-GALNS y AAV-SUMF1), que en el virus nativo (AAV2).

Transfección de células HEK293 con los vectores virales. Se transfectaron células HEK293 con el vector AAV-GALNS y la actividad enzimática en los lisados celulares y medios de cultivo se determinó a los 2, 4, 8 y 10 días después de la transfección (figura 2). Se observó un aumento en la actividad enzimática a partir del segundo día después de la transfección, y se logró un incremento en la actividad hasta de 20 veces los valores observados en las células sin transfectar ($0,63 \pm 1,10$ U/mg). Los valores de actividad enzimática se mantuvieron

relativamente constantes durante los 10 días de cultivo y sólo se observó un ligero aumento en la actividad, no significativo ($p > 0,05$), con una actividad enzimática final de $12,64 \pm 1,25$ U/mg al cabo de los 10 días, correspondiente a 20 veces los valores observados en células sin transfectar. En el medio de cultivo no se detectó actividad enzimática durante los 10 días siguientes al cultivo. Debido a que los mayores valores de actividad se obtuvieron en el cuarto día después de la transfección, este intervalo fue seleccionado para los ensayos en fibroblastos de mucopolisacaridosis IV A y las cotransfecciones con CMV-SUMF1.

El análisis del ADN y el ARNm viral se muestra en la figura 3. El ADN

viral se amplificó empleando cebadores específicos para el ADNc de GALNS, los cuales reconocen secuencias ubicadas en los exones 10 (TOMF23) y 12 (TOMF34R), evitando interferencia del ADN genómico. Como se muestra en la figura 3A, la cantidad de ADN viral del vector AAV-GALMS se mantuvo constante durante los 10 días de cultivo. En cuanto al análisis del ARNm, la primera cadena de ADN fue sintetizada por RT-PCR empleando oligo-dT y, posteriormente, el ARNm viral fue amplificado con los mismos cebadores empleados para el análisis del ADN viral (figura 3B). Como se observó en el perfil de actividad enzimática, las células HEK293 presentaron niveles basales de ARNm GALNS. El perfil

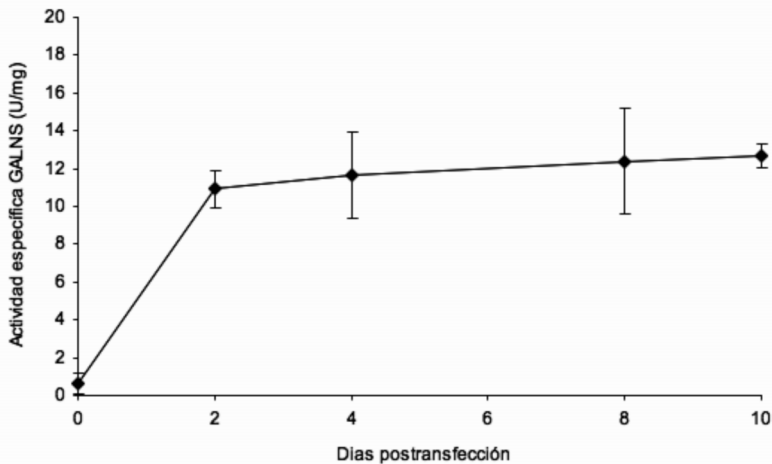


Figura 2. Transfección de células HEK293 con el vector AAV-GALNS. La actividad enzimática en el lisado celular fue cuantificada por el método fluorométrico a los 2, 4, 8 y 10 días después de la transfección. No se detectó actividad en el medio de cultivo.

de expresión de ARNm fue similar al observado en la actividad enzimática, aunque en este caso se observó un pico de expresión hacia el cuarto día (alrededor de 1,4 veces los valores basales), un leve descenso en el octavo día, para finalmente alcanzar su valor final, 1,14 veces los valores basales.

La cotransfección con AAV-SUMF1 en una relación 1:1 produjo un incremento en la actividad GALNS de 2,4 veces ($p < 0,01$), con respecto a las células transfectadas sin CMV-SUMF1 (figura 4A). Se observó un incremento adicional en la actividad de 1,8 veces ($p < 0,01$), cuando se em-

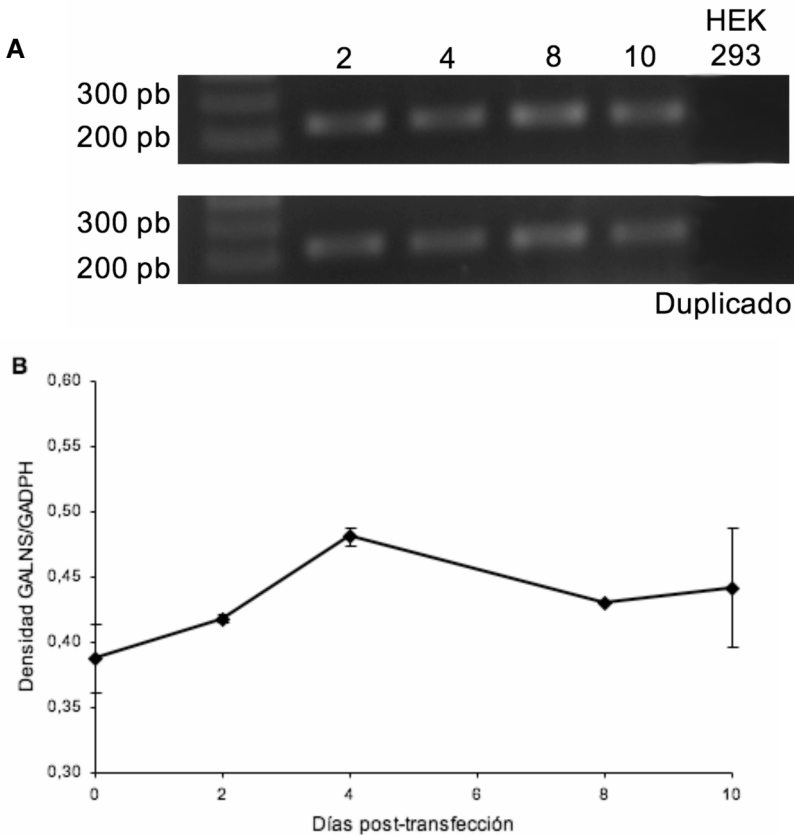


Figura 3. Análisis del ADN y ARNm viral en células HEK293 transfectadas con los vectores virales. Células HEK293 fueron transfectadas con 2×10^{10} vg de AAV-GALNS y tripsinizadas a los 2, 4, 8 y 10 días después de la transfección. (A) El ADN viral se amplificó empleando cebadores específicos para el ADNc de GALNS. (B) El perfil de expresión del ARNm viral fue construido con la relación de la densidad de la banda de GALNS Vs. la de GADPH. La densidad de las bandas (intensidad/mm²) fue medida empleando el programa ImageJ 1.38x.

pleó una relación 1:2 GALNS:SUMF1, lo cual corresponde a un aumento final en la actividad de 82,1 (51,7±5,59 U/mg) veces con respecto a los valores encontrados en células HEK293 sin transfectar. No se detectó actividad en el medio de cultivo de células HEK293 sin transfectar o en células transfectadas únicamente con CMV-GALNS. Sin embargo, la coexpresión con SUMF1 en una relación 1:1 llevó a un leve incremento en la actividad (figura 4A). Se observó un incremento adicional de 1,8 ($p < 0,05$) cuando las células fueron cotransfectadas en una relación 1:2 GALNS:SUMF1.

Transfección de fibroblastos y condrocitos con mucopolisacaridosis IV A. En los fibroblastos humanos con Morquio A, la transfección con AAV-GALNS permitió alcanzar valores de actividad enzimática correspondientes al 36,5% respecto a la actividad en fibroblastos normales (figura 4B). Como se observó en HEK293, la cotransfección con AAV-SUMF1 en una relación 1:1 llevó a un incremento de 1,6 veces en la actividad GALNS, lo que permitió alcanzar el 60% de la actividad enzimática normal (8,05±0,69 U/mg vs. 13,47±1,46 U/mg). Un incremento adicional de 1,5 veces se observó cuando se empleó la relación GALNS: SUMF1 1:2. A diferencia de lo observado en el medio de las células HEK293, en fibroblastos de mucopolisacaridosis IV A, la actividad en el medio de cultivo sólo fue detec-

tada cuando éstos fueron cotransfectados con SUMF1 en una relación 1:2 (figura 4B), lográndose un valor de 0,36±0,31 U/ml, el cual fue 1,9 veces los valores obtenidos en fibroblastos normales.

En condrocitos de ratón *knock-out* con mucopolisacaridosis IV A, la transfección con AAV-GALNS produjo niveles enzimáticos en el lisado celular equivalentes a 70% del valor encontrado en condrocitos de ratón normales (24,12±6,23 U/mg vs. 34,0±16,47 U/mg) (figura 5). A diferencia de los resultados obtenidos en células HEK293 y fibroblastos, la cotransfección con SUMF1 no tuvo efecto sobre la actividad GALNS en el lisado celular. En el medio de cultivo, los valores de actividad enzimática en condrocitos transfectados con AAV-GALNS fueron 2,3 veces mayores que los normales (figura 4C). La cotransfección con AAV-SUMF1 no produjo un incremento en la actividad GALNS en las células cotransfectadas con AAV-GALNS.

Discusión

La enfermedad de Morquio A, o mucopolisacaridosis IV A (MPS IV A), es una enfermedad de depósito lisosomal rara que afecta, en promedio, 1 de 250.000 nacidos vivos (www.morquio.com). Aunque no existen cifras sobre la incidencia de esta enfermedad en Colombia, los estudios

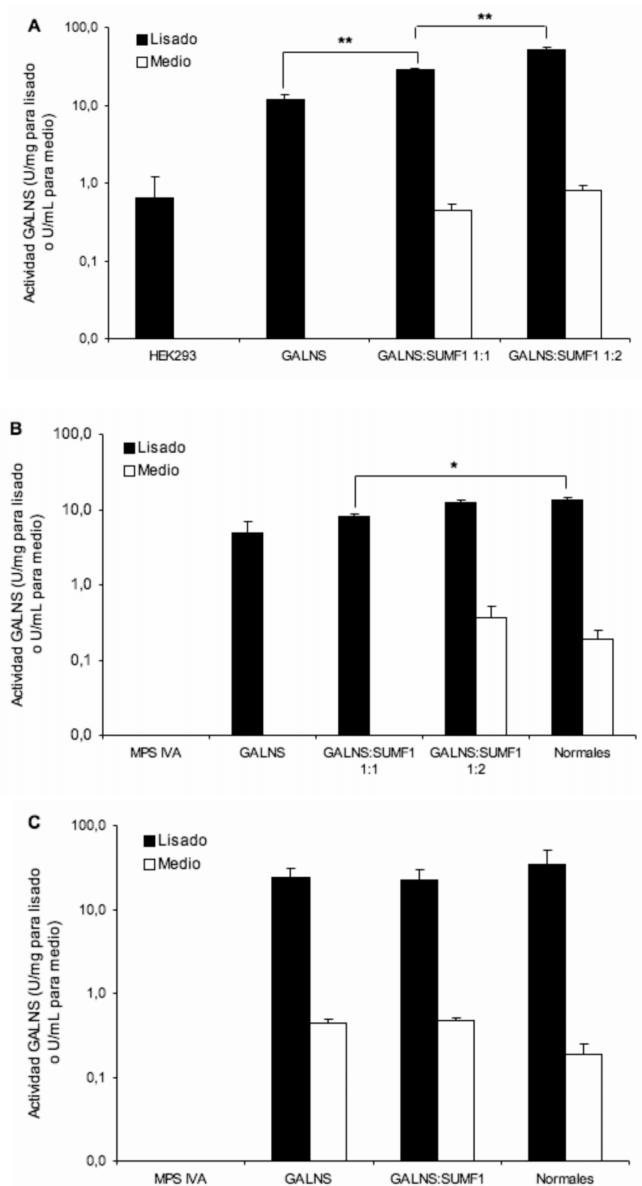


Figura 4. Cotransfección de vectores AAV-GALNS y AAV-SUMF1. (A) Células HEK293 fueron cotransfectadas con 1×10^{10} vg de AAV-GALNS y AAV-SUMF1 en una relación 1:1 y 1:2. (B) Fibroblastos humanos de piel con mucopolisacaridosis IV A fueron cotransfectados con 1×10^{10} vg de AAV-GALNS y AAV-SUMF1 en una relación 1:1 y 1:2. (C) Condrocitos de ratón con mucopolisacaridosis IV A fueron cotransfectados con 1×10^{10} vg de AAV-GALNS y AAV-SUMF1 en una relación 1:2. La actividad enzimática en el lisado celular y el medio de cultivo fue determinada fluorométricamente 4 días después de la transfección. *, $p < 0,05$ y **, $p < 0,01$.

preliminares apuntan a éste podría ser uno de los países con mayor número de individuos afectados por esta enfermedad[5, 6]. En la actualidad, no se dispone de un tratamiento específico, por lo cual se maneja exclusivamente mediante correcciones quirúrgicas y tratamiento farmacológico[3].

La mucopolisacaridosis IV A es una excelente candidata para tratamiento por terapia de remplazo enzimático, terapia génica o terapia de reducción de sustrato, debido a la ausencia de síntomas del sistema nervioso central. Las observaciones en otras enfermedades por depósito lisosómico de importantes correcciones bioquímicas y clínicas con niveles de actividad enzimática de 10% o menos[13, 24] y los altos costos y efectos adversos asociados con la terapia de remplazo enzimático[12, 38], constituyen hallazgos a favor del desarrollo de una estrategia de terapia génica para esta enfermedad. Igualmente, el reporte de correcciones completas de la enfermedad en diferentes modelos animales (ratón, rata, gato, perro), son hallazgos a favor de la posibilidad de realizar la corrección del defecto enzimático en humanos[13, 24, 25]. En el desarrollo de una estrategia de terapia génica para la mucopolisacaridosis IV A, en el presente trabajo se evaluó la capacidad de un vector derivado de virus adenoasociados (AAV) que portan el gen GALNS, para transfectar diferentes tipo de células.

Además, se evaluó el efecto de la co-transfección con un vector portando el gen humano de SUMF1.

La transfección de células HEK 293 mostró que AAV-GALNS es capaz de entrar en la célula y expresar el gen GALNS (figura 2). Como se muestra en el análisis del ADN durante los diez días de seguimiento, las variaciones observadas en la actividad enzimática no fueron producto de pérdidas del ADN viral durante el proceso de división celular (figura 3A). Por el contrario, estas variaciones estuvieron relacionadas con el nivel de ARNm, lo cual muestra que la actividad enzimática estuvo directamente relacionada con la expresión inducida por el promotor CMV (figura 3B). Es importante anotar, en ese punto, que la enzima GALNS presenta una vida media de 30 minutos a pH neutro[39, 35], por lo que la actividad encontrada en las células HEK293 transfectadas no fue producto de enzima presente en las preparaciones virales.

Como se observa en la figura 4, los valores de actividad GALNS en el lisado celular fueron mayores en células HEK293, seguidos por los observados en condrocitos de ratón y, finalmente, los encontrados en fibroblastos humanos. Esta diferencia puede deberse a factores propios de la células, como eficiencia de transcripción, transducción, de entrega de la proteína a su sitio de acción (tráfico

desde el retículo endoplasmático hasta el lisosoma) y lo más importante, el tipo y la extensión del procesamiento posterior a la transducción. Aunque HEK293 no es el sistema de expresión de proteínas recombinantes más usado, presenta una mayor eficiencia para la expresión de un transgen que la observada por cultivos celulares primarios[40]. Otros aspectos que pueden afectar los niveles de actividad son la eficiencia en la entrada del vector por una expresión diferencial de los receptores de membrana o las diferencias en el tráfico del vector en el interior de cada célula[40, 41].

Desde el descubrimiento y aislamiento del gen SUMF1, el cual codifica para la enzima activadora de sulfatasas o enzima generadora de formilglucina, y su asociación con la deficiencia múltiple de sulfatasas, la coexpresión con SUMF1 ha mostrado ser de gran importancia, tanto en la producción de enzimas para terapia de replazo enzimático, como en el tratamiento de estas enfermedades mediante terapia génica[42, 43]. Cuando una sulfatasa lisosomal es sobreexpresada, su activación es incompleta, lo que se manifiesta por una disminución de los rendimientos de producción, para el caso de la terapia de replazo enzimático[42]. De otro lado, esta sobreexpresión puede reducir la actividad enzimática de otras sulfatasas, lo que lleva a la obtención de un beneficio parcial de la terapia, pues la

cantidad endógena de SUMF1 no es suficiente para la activación de la sulfatasa que se encuentra sobreexpresada y la de las otras sulfatasas[42].

La cotransfección con AAV-GALNS y AAV-SUMF1 en células HEK293 y fibroblastos humanos de mucopolisacaridosis IV A, produjo un incremento en la actividad de hasta 4,5 y 2,6 veces, respectivamente, en una relación 1,2; mientras que, en condrocitos de ratón con mucopolisacaridosis IV A cotransfectados con SUMF1, el incremento de actividad fue de 1,3 veces (figura 4). Cosma *et al.* (42) reportaron un incremento de 16, 3, 1,5 y 2 veces en la actividad de arilsulfatasa A en células COS-7, hepáticas, HEK293 y U2OS (línea celular de osteosarcoma), respectivamente, cotransfectadas con vectores derivados del virus del herpes simplex, que portaban los genes de arilsulfatasa A y SUMF1. Por otro lado, Takakusaki *et al.*[44] reportaron un incremento en la actividad de arilsulfatasa A de 5,8 y 6,1 veces en células HEK293 cotransfectadas mediante liposomas, con plásmidos que portaban los dos genes.

Uno de los trabajos más completos en este campo fue el desarrollado por Fraldi *et al.*[22] en el cual se evaluó el efecto de la coexpresión de SUMF1 sobre 5 sulfatasas, empleando vectores lentivirales y virus adenoasociados en fibroblastos de leucodistrofia meta-

cromática, condrodisplasia punctata ligada al X, y mucopolisacaridosis II, III y VI. El incremento en la actividad de las sulfatasas estuvo entre 1 y 2,1 veces, con respecto al observado en células no cotransfectadas con SUMF1; e incrementos en la relación sulfatasa:SUMF1 por encima de 1:2 no produjeron incrementos significativos en la actividad o en la reducción de los glucosaminoglicanos[22], motivo por el cual en el presente trabajo sólo se evaluaron las relaciones GALNS:SUMF1 1:1 y 1:2.

En cuanto a la coexpresión de GALNS y SUMF1 en células HEK293, los valores reportados en el presente trabajo son 1,7 veces mayores que los reportados por la cotransfección de dos plásmidos que porten el gen de GALNS y SUMF1 bajo el control del promotor CMV, mediante el uso de liposomas[45]. Aunque es difícil comparar los resultados del presente trabajo con los reportados en la literatura debido que existe un claro efecto de la enzimas (a pesar de que todas son sulfatasas), promotores, técnicas de transfección y vectores, los incrementos en la actividad enzimática fueron similares a los observados con otras sulfatasas.

Otro hallazgo similar a lo observado en reportes de literatura[44, 22], y de gran importancia en terapia génica, fue el incremento de la actividad en el medio de cultivo de las células

cotransfectadas con SUMF1, el cual también fue dependiente del tipo de célula utilizada. En células HEK293, la actividad en medio fue observada con una relación 1:1 e incrementada hasta 4 veces cuando se empleó la relación 1:2, mientras que, en fibroblastos humanos de mucopolisacaridosis IV A, esta actividad en el medio se detectó exclusivamente en células cotransfectadas en una relación 1:2. Esta diferencia entre la línea celular HEK293 y los fibroblastos humanos de mucopolisacaridosis IV A (un cultivo primario), está relacionada con la mayor eficiencia de HEK293 para exportar proteínas al medio[40].

Por su parte, los condrocitos de ratón con mucopolisacaridosis IV A presentaron un comportamiento interesante. La transfección de los vectores AAV sin CMV-SUMF1 llevó a un incremento en la actividad enzimática en el medio de cultivo (figura 4), con valores de actividad promedio superiores a los observados en el medio de cultivo de condrocitos de ratón normales, mientras que la cotransfección con AAV-SUMF1 no produjo un incremento en la actividad GALNS en el medio de células cotransfectadas con AAV-GALNS. Estos resultados en condrocitos apuntan hacia la existencia de un mecanismo de control o de una ruta saturable durante el procesamiento de la enzima en estas células, que regulan los niveles de enzima que son secretados. El incremento en la

actividad GALNS en el medio de cultivo de células cotransfectadas con SUMF1 está relacionado con el incremento en la estabilidad de la enzima, que evita su degradación y permite superar un umbral de enzima activa en el interior de la célula, por encima del cual ésta es secretada en mayor proporción[44].

Los valores de actividad enzimática en el lisado celular y el medio de cultivo fueron menores que los reportados por Toietta *et al.*[29], quienes emplearon retrovirus para transfectar diferentes cultivos celulares. Aunque los retrovirus presentan la ventaja de generar elevados niveles de expresión y transfectar diferentes tipos de células, su principal desventaja radica en la capacidad de generar cánceres por mutagénesis por inserción o activación de oncogenes tras su integración.

Hacein-Bey-Abina *et al.*[46] reportaron la generación de leucemia en 4 de 10 niños con inmunodeficiencia combinada grave tratados con células hepatomopoyéticas transfectadas con un vector retroviral. En los cuatro casos, el efecto adverso se produjo por la activación de diferentes oncogenes y sólo tres de ellos respondieron positivamente a la quimioterapia[47]. Por el contrario, los vectores AAV se presentan como vectores más seguros, pues permanecen principalmente de manera episómica[48] y, con excepción de los hallazgos de Donsante *et*

al.[49], quienes detectaron la aparición de hepatocarcinomas en ratones con mucopolisacaridosis VII, no se han generado efectos adversos importantes en 60 estudios clínicos realizados a la fecha, algunos de ellos con más de 8 años de seguimiento (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en trabajos previos con el gen GALNS, se destaca que los valores de actividad enzimática fueron mayores que los obtenidos con vectores AAV (30) y plásmidos transfectados por métodos no virales[45]. En el primer caso, el incremento en la actividad enzimática puede ser producto de la purificación de los vectores, mientras que, en el segundo, el incremento se debe a la mayor eficiencia de entrega del gen por parte del vector AAV que cuando se emplean métodos no virales. En la actualidad, estos vectores y otros que portan promotores eucarióticos están siendo evaluados, tanto *in vitro* como *in vivo*, en la búsqueda de la mejor estrategia de terapia génica para la enfermedad de Morquio A.

Conclusiones

El vector AAV-GALNS permitió la expresión del gen GALNS en células HEK293, fibroblastos humanos de mucopolisacaridosis IV A y condrocitos de ratón con mucopolisacaridosis IV A,

lográndose un incremento en la actividad enzimática entre 5 y 24 veces los valores basales. La cotransfección con AAV-SUMF1 permitió un incremento hasta de 4,2 veces en la actividad GALNS, con respecto a células transfectadas con AAV-GALNS, llevando a la obtención de valores de actividad normales en fibroblastos de mucopolisacaridosis IV A cotransfectados en una proporción AAV-GALNS:AAV-SUMF1 1:2. La cotransfección con AAV-SUMF1 permitió la detección de la actividad enzimática en el medio de cultivo de células que coexpresan GALNS y SUMF1, lo cual tiene un efecto importante sobre la capacidad de utilizar la corrección cruzada, mediante el uso de receptores de manosa-6-fosfato, para corregir células no transfectadas. Aunque es necesario el desarrollo de estudios *in vivo* en el modelo de ratón con mucopolisacaridosis IV A, para observar la capacidad de corregir la enfermedad, estos resultados muestran el potencial de los vectores AAV y de la coexpresión con SUMF1, para lograr niveles terapéuticos de actividad enzimática para la corrección del defecto genético en la enfermedad de Morquio A.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo de la Iniciativa Genómica Javeriana (proyecto número ID 000950) y la Organización Internacional Morquio. Carlos Javier Alméciga-Díaz recibió una beca del Instituto Colombiano para

el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología, Colciencias.

Bibliografía

1. Neufeld, E, Muenzer, J. The Mucopolysaccharidosis. In: Scriver, C, Beaudet, A, Sly, W, Valle, D. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, vol. III. McGraw-Hill: New York. 2001;3421-52.
2. Lankester, B, Whitehouse, M, Gargan, MF. *Morquio syndrome*. *Curr Orthop*. 2006;20:128-31.
3. Montaña, AM, Tomatsu, S, Gottesman, G, Smith, M, Orii, T. International Morquio A registry: Clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30:165-74.
4. Bernal, J, Briceño, I. Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco-La Tolita culture in Colombia, Ecuador. *Clin Genet*. 2006;70:188-91.
5. Kato, Z, Fukuda, S, Tomatsu, S, Vega, H, Yasunaga, T, Yamahishi, A, *et al*. A Novel Common Missense Mutation G301C in the N-Acetylgalactosamine-6-sulfate Sulfatase Gene in Mucopolysaccharidosis IVA. *Hum Genet* 1997;101:97-101.
6. Barrera, L, Echeverri, O, Espinosa, E. Errores innatos del metabolismo. En: Correa, J, Gómez, J, Posada, R. eds. *Fundamentos de Pediatría*, vol. 3. Corporación para Investigaciones Biológicas: Medellín. 2007;356 - 96.
7. Olsen, H, Baggesen, K, Sjolie, A. Cataracts in Morquio syndrome. *Ophthalmic Paediatr Genet*. 1993;14:87-9.

8. Mikles, M, Stanton, R. A review of Morquio syndrome. *Am J Orthop.* 1997;26:533-40.
9. Vellodi, A, Young, EP, Cooper, A, Wraith, JE, Winchester, B, Meaney, C, et al. Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centres. *Arch Dis Child.* 1997;76:92-9.
10. Ashworth, JL, Biswas, S, Wraith, E, Lloyd, IC. Mucopolysaccharidoses and the eye. *Surv Ophthalmol.* 2006;51:1-17.
11. Tomatsu, S, Montañó, A, Ohashi, A, Oikawa, H, Oguma, T, Dung, V, et al. Enzyme replacement therapy in a murine model of Morquio A syndrome. *Hum Mol Genet.* 2008;17:815-24.
12. Butler, J, Kodonaga, J. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Dev.* 2002;16:2583-92.
13. Ellinwood, M, Vite, C, Haskins, M. Gene therapy for lysosomal storage diseases: the lessons and promise of animal models. *J Gene Med.* 2004;6:481-506.
14. Cheng, S, Smith, A. Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders. *Gene Ther.* 2003;10:1275-81.
15. Liu, Y, Xu, L, Henning, A, Kovacs, A, Fu, A, Chung, S, et al. Liver-directed neonatal gene therapy prevents cardiac, bone, ear, and eye disease in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Ther.* 2005;11:35-47.
16. Tessitore, A, Faella, A, O'Malley, T, Cotugno, G, Doria, M, Kunieda, T, et al. Biochemical, Pathological, and Skeletal Improvement of Mucopolysaccharidosis VI After Gene Transfer to Liver but Not to Muscle. *Mol Ther.* 2008;16:30-7.
17. Ponder, KP, Melniczek, JR, Xu, L, Weil, MA, O'Malley, TM, O'Donnell, PA, et al. Therapeutic neonatal hepatic gene therapy in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:13102-307.
18. Mango, RL, Xu, L, Sands, MS, Vogler, C, Seiler, G, Schwarz, T, et al. Neonatal retroviral vector-mediated hepatic gene therapy reduces bone, joint, and cartilage disease in mucopolysaccharidosis VII mice and dogs. *Mol Genet Metab.* 2004;82:4-19.
19. Sferra, T, Backstrom, K, Wang, C, Rennard, R, Miller, M, Hu, Y. Widespread Correction of Lysosomal Storage Following Intrahepatic Injection of a Recombinant Adeno-associated Virus in the Adult MPS VII Mouse. *Mol Ther.* 2004;10:478-91.
20. Traas, AM, Wang, P, Ma, X, Tittiger, M, Schaller, L, O'donnell, P, et al. Correction of Clinical Manifestations of Canine Mucopolysaccharidosis I with Neonatal Retroviral Vector Gene Therapy. *Mol Ther.* 2007;15:1423-31.
21. Schmidt, B, Selmer, T, Ingendoh, A, von Figura, K. A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell.* 1995;82:271-8.
22. Fraldi, A, Biffi, A, Lombarda, A, Visigalli, I, Pepe, S, Setiembre, C, et al. SUMF1 enhances sulfatase activities in vivo in five sulfatase deficiencies. *Biochem J.* 2007;403:305-12.

23. Fraldi, A, Hemsley, H, Crawley, A, Lombardi, A, Lau, A, Sutherland, L, *et al.* *Functional correction of CNS lesions in MPS-III mouse model by intracerebral AAV-mediated delivery of sulfamidase and SUMF1 genes.* Hum Mol Genet. 2007;16:2693-702.
24. Sands, M, Davidson, B. *Gene Therapy for Lysosomal Storage Diseases.* Mol Ther. 2006;13:839-49.
25. Ponder, K, Haskins, M. *Gene therapy for mucopolysaccharidosis.* Expert Opin Biol Ther. 2007;7:1333-45.
26. Flotte, T. *Gene Therapy Progress and Prospects: Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors.* Gene Ther. 2004;11:805-10.
27. Hartung, SD, Frandsen, JL, Pan, D, Koniari, BL, Graupman, P, Gunther, R, *et al.* *Correction of Metabolic, Craniofacial, and Neurologic Abnormalities in MPS I Mice Treated at Birth with Adeno-associated Virus Vector Transducing the Human A-L-Iduronidase Gene.* Mol Ther. 2004;9:866-75.
28. Cardone, M, Polito, VA, Pepe, S, Mann, L, D'Azzo, A, Auricchio, A, *et al.* *Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery.* Hum Mol Genet. 2006;15:1225-36.
29. Toietta, G, Severini, G, Traversari, C, Tomatsu, S, Sukegawa, K, Fukuda, S, *et al.* *Various cells retrovirally transduced with N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase correct Morquio skin fibroblasts in vitro.* Hum Gene Ther. 2001;12:2007-16.
30. Gutiérrez, M, García-Vallejo, F, Tomatsu, S, Ceron, F, Alméciga-Díaz, C, Domínguez, M, *et al.* Construcción de un vector de expresión derivado de virus adenoasociados para corregir in vitro el defecto genético en la enfermedad de Morquio A. *Biomedica.* 2008;28:448-59.
31. Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology,* Wiley John & Sons Inc: Hoboken. 1999.
32. Xiao, X, Li, J, Samulski, R. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol.* 1998;72:2224-32.
33. Zolotukhin, S, Byrne, B, Mason, E, Zolotukhin, I, Potter, M, Chesnut, K, *et al.* *Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield.* Gene Ther. 1999;6:973-85.
34. Sommer, JrM, Smith, PH, Parthasarathy, S, Isaacs, J, Vijay, S, Kieran, J, *et al.* *Quantification of Adeno-Associated Virus Particles and Empty Capsids by Optical Density Measurement.* Mol Ther. 2003;7:122-8.
35. Tomatsu, S, Montaña, A, Gutiérrez, M, Grubb, J, Oikawa, H, Dung, V, *et al.* *Characterization and pharmacokinetic study of recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase.* Mol Genet Metab 2007; 91:69-78.
36. Peterson, G. Review of the Folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem.* 1979;100:201-20.
37. van Diggelen, O, Zhao, H, Kleijer, W, Janse, H, Poorthuis, B, Pelt, Jv, *et al.* *A fluorometric enzyme assay for the di-*

- agnosis of Morquio type A. Clin Chem Acta.* 1990;187:131-40.
38. Rohrbach, M, Clarke, J. *Treatment of lysosomal storage disorders: progress with enzyme replacement therapy. Drugs.* 2007;67:2697-716.
 39. Masue, M, Sukegawa, K, Orii, T, Hashimoto, T. *N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in human placenta: purification and characteristics. J Biochem.* 1991;110:965-70.
 40. Thomas, P, Smart, TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2005;51:187-200.
 41. Aucoin, MG, Perrier, M, Kamen, AA. *Critical assessment of current adeno-associated viral vector production and quantification methods. Biotechnol Adv.* 2008;26:73-88.
 42. Cosma, M, Pepe, P, Annunziata, I, Newbold, R, Grompe, M, Parenti, G, et al. *The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. Cell.* 2003;113:445-6.
 43. Dierks, T, Schmidt, B, Borissenko, LV, Peng, J, Preusser, A, Mariappan, M, et al. *Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. Cell.* 2003;113:435-44.
 44. Takakusaki, T, Hisayasu, S, Hirai, Y, Shimada, T. *Coexpression of Formylglycine-Generating Enzyme Is Essential for Synthesis and Secretion of Functional Arylsulfatase A in a Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy. Hum Gene Ther.* 2005;16:929-36.
 45. Alméciga-Díaz, C, Rueda, MA, Espejo, A, Echeverri, O, Montano, AM, Tomatsu S, et al. *Effect of Elongation Factor 1? promoter and SUMF1 over in-vitro expression of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. Mol Biol Rep.* 2009;36:1863-70.
 46. Hacein-Bey-Abina, S, von Kalle, C, Schmidt, M, Le Deist, F, Wulffraat, N, McIntyre, E, et al. *A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med.* 2003;348:255-6.
 47. Hacein-Bey-Abina, S, Garrigue, A, Wang, GP, Soulier, J, Lim, A, Morillon, E, et al. *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J Clin Invest.* 2008;118:3132-42.
 48. Smith, RH. *Adeno-associated virus integration: virus versus vector. Gene Ther.* 2008;15:817-22.
 49. Donsante, A, Miller, DG, Li, Y, Vogler, C, Brunt, EM, Russell, DW, et al. *AAV Vector Integration Sites in Mouse Hepatocellular Carcinoma. Science.* 2007;317:477.