
CONTRIBUCIÓN COLOMBIANA AL CONOCIMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE MORQUIO A

Carlos Javier Alméciga Díaz¹, Adriana María Montaña Suárez²,
Shunji Tomatsu³, Luis Alejandro Barrera A.⁴

RESUMEN

La enfermedad de Morquio A o Mucopolisacaridosis IV A es un trastorno de depósito lisosomal producida por alteración en la actividad de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) encargada de la degradación de queratán y condroitin-6- sulfato. La enfermedad se caracteriza por alteraciones óseas, cardíacas y pulmonares. Aunque esta enfermedad es rara, algunos trabajos sugieren que Colombia puede ser uno de los países con mayor número de pacientes. En el presente artículo se revisará el estado actual de la enfermedad de Morquio A, haciendo especial énfasis en los aportes realizados por investigadores colombianos para su avance. Progresos importantes se han realizado en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, modelos animales, terapia de reemplazo enzimático y terapia génica. En este último aspecto, el *Instituto de Errores Innatos del Metabolismo* ha jugado un papel importante en el diseño y evaluación de vectores derivados de virus adenoasociados, para el desarrollo de una estrategia de terapia génica para la enfermedad de Morquio A.

Palabras clave: Mucopolisacaridosis IV A, enfermedad de Morquio A, terapia génica, vectores adenoasociados, direccionamiento a hueso.

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

² MD, PhD. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Saint Louis University, St. Louis, MO, USA. PhD

³ Dupont Institute Hospital for Children, Wilmington, DE, USA.

⁴ M.Sc.PhD. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

COLOMBIAN CONTRIBUTION TO KNOWLEDGE OF MORQUIO A DISEASE

ABSTRACT

Morquio A disease or Mucopolysaccharidosis type IV A is a lysosomal storage disorder produced by deficiency of the enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS), which is involved in the degradation of the glycosaminoglycans keratan sulfate and chondroitin-6-sulfate. Morquio A patients are mainly characterized by bone, heart and lung manifestations. Although this is a rare disorder, some studies suggest that Colombia could be one of the countries with the highest number of Morquio A patients. This one is a State-of-the-Art review paper of the condition, furthermore emphasizing the contributions of colombian researchers to the study of Morquio A disease. Significant progresses have been done in the development of new diagnostic techniques, animal models, enzyme replacement therapy, and gene therapy. Recently the *Institute for the Study of Inborn Errors of Metabolism* has played a significant role in the design and evaluation of adenoassociated virus-derived vectors, towards the development of a gene therapy strategy for Morquio A.

Key words: Mucopolysaccharidoses IV A, Morquio A, gene therapy, adenoassociated virus vectors, bone targeting.

INTRODUCCIÓN

La N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) es la enzima lisosomal encargada del catabolismo de los glicosaminoglicanos (GAGs) queratán sulfato (QS) y condroitín-6-sulfato (C6S), mediante la remoción del sulfato presente en los residuos de galactosa y N-acetilgalactosamina, respectivamente (1). La deficiencia en la actividad de GALNS produce la mucopolisacaridosis IV A (MPS IVA, OMIM 253000) o enfermedad de Morquio A, en la que el QS y C6S se acumulan en el interior del lisosoma, produciendo alteraciones en la estructura celular de diferentes tejidos, principalmente en hueso, cartílago y córnea (1). La enfermedad fue inicialmente descrita por el pediatra uruguayo Luís Morquio en 1929, en 4 hermanos que presentaban una distrofia esquelética

familiar severa (2). Las principales características de los pacientes con MPS IVA incluyen: displasia esquelética severa, hipoplasia de la odontoides, pectus carinatum, genu valgum, laxitud de articulaciones, opacidad corneal, enfermedad de válvulas cardíacas y alteraciones respiratorias y auditivas; sin las alteraciones del sistema nervioso central observadas en otras MPS (1, 3, 4).

La MPS IVA es una enfermedad rara, con una incidencia que varía entre 1:45.000 nacidos vivos en Holanda y Portugal, a 1:76.000 nacidos vivos en Irlanda del Norte (3). Colombia no cuenta con cifras sobre la incidencia de esta enfermedad, sin embargo, algunos estudios sugieren que Colombia podría ser uno de los países con mayor número de individuos afectados con MPS IV A (5, 6). Adicionalmente, se ha documentado el hallazgo de

esculturas precolombinas con claros rasgos de individuos afectados con MPS IVA; lo que sugiere la presencia del desorden en nuestra población desde la época prehispánica y la existencia de un efecto fundador (7).

En la actualidad no existe un tratamiento efectivo para los pacientes afectados por esta enfermedad y su manejo es realizado mediante terapia farmacológica (control del dolor e infecciones) y correcciones quirúrgicas (3). El trasplante de médula ósea no es una alternativa viable para el tratamiento de pacientes MPS IVA debido a sus limitados efectos sobre las anomalías esqueléticas y oculares (8). Por su parte, la terapia de reemplazo enzimático, que ha probado ser de gran utilidad en otras MPS y enfermedades de depósito lisosomal, ha mostrado resultados promisorios en sus etapas preclínicas (9-12), y en la actualidad se adelantan ensayos clínicos de fase I/II y III (<http://www.morquibmrn.com>). La terapia génica, ampliamente explorada en modelos animales de casi todas las mucopolisacaridosis (13), ha mostrado ser una alternativa viable para el tratamiento de la MPS IV A, a pesar de aun encontrarse en etapas preclínicas (14-17).

En este artículo se presenta una revisión sobre la enfermedad de Morquio A, destacando los aportes realizados por nuestros grupos de investigación para su diagnóstico y tratamiento.

EL GEN Y LA ENZIMA GALNS

El gen humano *GALNS* se encuentra localizado en el cromosoma 16q24.3 y posee una longitud de 50 kb con 14 exones y 13 intrones (18). Un ARNm de 2,3 kb es sintetizado a partir del gen *GALNS*, con un marco abierto de lectura de 1,5 kb que codifican para una proteína de 522 aminoácidos (19). El contenido GC en la región reguladora 5', sumado a la ausencia de una caja TATA y la presencia de un alto número de sitios de unión para el factor de

transcripción Sp1, sugieren que este es un gen de expresión constitutiva (15, 18).

Cerca de 150 mutaciones han sido identificadas en el gen *GALNS*, incluyendo mutaciones de sentido errado (69%), sin sentido (5%), alteraciones de corte y empalme (7%), deleciones pequeñas (13%) y grandes (2%), e inserciones (4%). El 46% de estas mutaciones ocurren menos de tres veces en el total de la población sugiriendo una elevada heterogeneidad molecular en las mutaciones sobre el gen *GALNS* (20, 21). Para la población colombiana se identificaron las mutaciones p.G301C, p.S162F y p.F69V en pacientes del viejo Caldas, de las cuales la última no ha sido reportada en otras poblaciones (6, 20). Posteriormente, las mutaciones p.A75G y p.R386C fueron identificadas en pacientes del departamento de Boyacá (Saboya y Chiquinquirá), de las cuales la primera no se ha identificado aún en otros pacientes latinoamericanos (22).

A pesar de la elevada heterogeneidad molecular de las mutaciones, se han observado algunas asociaciones genotipo-fenotipo. Así, la mayoría de las mutaciones puntuales están asociadas con fenotipos atenuados, mientras que mutaciones sin sentido, deleciones grandes y alteraciones del sitio de corte y empalme se encuentran asociadas con fenotipos severos (20).

La enzima *GALNS* es un homodímero de 120 kDa, con monómeros de 60 kDa que son procesados a polipéptidos con un peso molecular de 40 kDa y 15 kDa unidos por un enlace disulfuro (23). Al igual que otras enzimas y proteínas lisosomales, *GALNS* posee un péptido señal de 26 residuos que dirige la proteína naciente al retículo endoplasmático (RE), en donde es inicialmente modificada por glicosilación cotranslacional en dos asparaginas (24). Esta glicosilación involucra la transferencia en bloque de un oligosacárido formado por tres glucosas, nueve manosas y 2 residuos de N-acetilglucosamina.

Antes de salir del RE tres residuos de glucosa y uno de manosa son removidos del oligosacárido (25) (Figura 1).

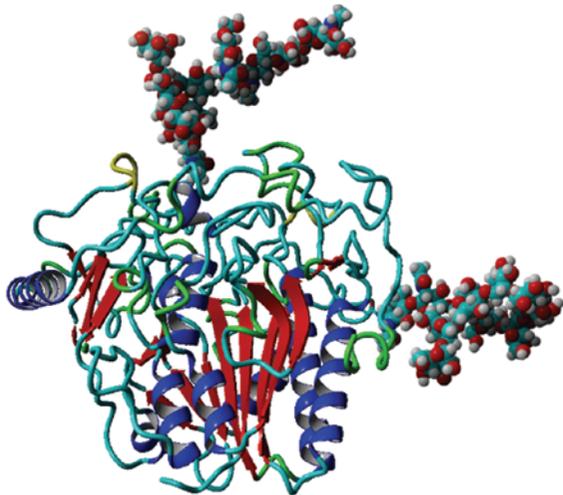


Figura 1. Estructura terciaria de GALNS.

La predicción de la estructura terciaria se realizó empleando el servidor I-tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). La predicción de los dos posibles sitios de glicosilación, así como la generación del modelo glicosilado fueron realizados con la herramienta GlyProt (<http://www.glycosciences.de/modeling/>).

Antes de ser plegada en el RE, GALNS es activada por la enzima generadora de formilglucina (FGE). FGE es una enzima del RE responsable de la conversión de cisteína a formilglucina en el sitio activo de las sulfatasas, representado por la secuencia consenso CXPSRXXX[L/M]TG[R/K/L] y ubicado en el extremo N-terminal de la proteína (26). Para el caso específico de GALNS humana el sitio activo se encuentra en la posición C79 (24). FGE es codificada por el gen *SUMF1* (Sulfatase Modifying Factor 1). Este gen es un factor limitante y esencial en la actividad de las sulfatasas por las siguientes razones: (i) mutaciones en *SUMF1* producen la deficiencia múltiple de sulfatasas, en donde la actividad de todas las sulfatasas se encuentra afectada, (ii) la sobreexpresión de una

sulfatasa produce activación parcial de la enzima y disminución en la actividad de otras sulfatasas por saturación del sistema, y (iii) la coexpresión de una sulfatasa con *SUMF1* lleva a un marcado incremento en la actividad de la respectiva sulfatasa (27, 28).

A diferencia de las proteínas de membrana o de la ruta secretora, en las que las cadenas de oligosacáridos son procesadas a unidades que contienen ácido siálico, las enzimas lisosomales son modificadas por la adición de residuos de fosfomanosil, el cual funciona como un componente esencial en el reconocimiento del receptor de manosa-6-fosfato en Golgi (29). Una vez llevadas a cabo estas modificaciones sobre la cadena de oligosacáridos, la enzima se une al receptor de manosa-6-fosfato y abandona Golgi en vesículas recubiertas de clatrina, que la dirigen al sistema endosomal/lisosomal. Cerca del 2 al 20% de la enzima es secretada antes de llegar al lisosoma, la cual puede ser recapturada de manera autocrina o paracrina por unión con receptores de manosa-6-fosfato ubicados en la membrana celular. Esta capacidad de captura celular y direccionamiento al lisosoma constituyen la base para el desarrollo de terapias de reemplazo enzimático, génica y celular (25, 29, 30).

CLÍNICA

La MPS IV A es una enfermedad caracterizada por la acumulación lisosomal de QS y C6S principalmente en hueso y córnea (1). El fenotipo de la enfermedad varía desde una forma severa caracterizada por una marcada displasia esquelética, estatura corta, facies toscas, hipoplasia de la odontoides, *pectus carinatum*, cifoescoliosis, *genu valgum*, laxitud de articulaciones, alteraciones auditivas, opacidad corneal, enfermedad de válvulas cardíacas, infecciones respiratorias recurrentes y hepatoesplenomegalia leve (Figura 2); a formas

atenuadas con menor compromiso óseo (1, 3, 4). Los pacientes con fenotipos severos sobreviven con frecuencia hasta la segunda o tercera década de vida, mientras que los individuos con fenotipos medios o atenuados pueden llegar a la séptima década de vida, siendo las principales causas de muerte la mielopatía cervical o la falla cardiaca (3).

Aunque los pacientes con MPS IV A no presentan las alteraciones sobre sistema nervioso central observadas en otras MPS, un reciente análisis de las funciones intelectuales y neurológicas de pacientes MPS IV A mostró anomalías cognitivas en cerca de la mitad de los individuos estudiados, así como problemas de atención y anomalías en las imágenes de resonancia magnética nuclear; sin identificarse patrones específicos que se pudieran

asociar directamente con la deficiencia de la enzima GALNS (31). A pesar del debate despertado por estos resultados, el estudio muestra la necesidad de continuar trabajando en este campo para entender el impacto de la alteración enzimática sobre el sistema nervioso central y periférico en pacientes Morquio A.

Los pacientes con MPS IV A no presentan manifestaciones clínicas al momento del nacimiento. Los primeros síntomas de la enfermedad, en la mayoría de los casos, se presentan alrededor del segundo año de vida, siendo los más comunes las deformidades óseas, la corta estatura y las anomalías en la marcha (3, 32). En la niñez temprana, los primeros problemas ortopédicos son la cifosis en la unión torácico-lumbar y una leve prominencia del esternón, la cual evoluciona rápidamente a *pectus carinatum* (3).



Hipoplasia de la odontoides

Pectus carinatum

Deformidades en muñecas, codos y hombros

Laxitud de articulaciones



Aplanamiento de la cabeza del fémur.
Pobre desarrollo del cuello femoral.
Alteraciones en la marcha
Genu valgum

Figura 2. Características Clínicas.

Principales características clínicas observadas en pacientes con fenotipo clásico de mucopolisacaridosis IV A.

La cabeza se encuentra desplazada hacia atrás debido al cuello corto, y aunque es normal en tamaño, parece anormalmente grande comparada con el cuerpo. El *genu valgum* aparece durante este periodo causando dificultades para caminar (4). Las deformidades de las articulaciones son evidentes en las muñecas, rodillas, tobillos, codos y hombros. En las extremidades superiores se presenta pérdida de movimiento, mientras que en las extremidades inferiores el aplanamiento de la cabeza del fémur y el pobre desarrollo del cuello femoral, llevan a un movimiento restringido de la cadera, alteraciones en la marcha y dolor al caminar o estar de pie (4, 33).

Al momento del nacimiento la longitud de los pacientes MPS IV A es similar a la observada en individuos no afectados. Durante los dos primeros años de vida en ambos géneros el percentil 50 de la altura es muy cercano al encontrado en poblaciones normales. Sin embargo, a partir del cuarto año de vida estos valores comienzan a caer rápidamente y los pacientes con fenotipo severo alcanzan su altura máxima a los 9 y 11 años en niñas y niños, respectivamente, mientras que los pacientes con fenotipo atenuado continúan creciendo hasta la adolescencia. La altura media de los pacientes MPS IV A adultos con fenotipo severo es en promedio 50 cm inferior a la observada en individuos control de la misma edad (34).

De igual forma, en el momento del nacimiento los pacientes MPS IV A presentan un peso similar o incluso ligeramente mayor con respecto a valores de individuos sanos. Cuando los pacientes alcanzan la adolescencia el peso se encuentra dos desviaciones estándar (DE) por debajo del valor observado en controles normales de la misma edad, llegando a estar hasta tres DE por debajo de los valores control cuando llegan a la edad adulta. Sin embargo, aproximadamente el 7% de la pacientes presenta sobrepeso y entre el 10 y 15% están en riesgo de sufrirlo, lo cual puede generar estrés en los huesos

y articulaciones, representando un factor de riesgo para el deterioro de la salud de los pacientes (34).

La alteración en la formación del cartílago y ligamentos se manifiestan principalmente en las vértebras, debido a una maduración anormal como resultado de una incompleta osificación endocondral. Las vértebras presentan platiespondilia con bordes irregulares, discos intervertebrales más angostos de lo normal y un canal espinal angosto (4, 35). Estas alteraciones llevan a hipoplasia de la odontoides, cifosis y compresión espinal, la cual puede producir alteraciones neurológicas como paraparesis, o incluso paraplejia o cuadriplejia (36-39).

A nivel bucal se presentan dientes pequeños, incisivos en forma de pala, dientes posteriores cóncavos y esmalte delgado y de color opaco o amarillento (40). Debido a los problemas óseos y de articulaciones que dificultan el cuidado personal, y a un esmalte delgado y frágil, los pacientes con MPS IV A desarrollan problemas de higiene oral que en ocasiones resultan en gingivitis (40).

Los problemas respiratorios en pacientes MPS IV A incluyen dificultad respiratoria por deformidades en la caja torácica, obstrucción de vías superiores durante la flexión de la cabeza, infecciones recurrentes, apnea del sueño (evidencia por ronquidos) y una tráquea angosta (41, 42). Un hallazgo importante es que a medida que los pacientes superan la expectativa de vida promedio (20 a 30 años), se observa la aparición de falla respiratoria progresiva tipo dos, que en la mayoría de los casos lleva a la muerte del paciente (41, 42).

DIAGNÓSTICO

El análisis de GAGs en orina fue el primer método disponible para el diagnóstico de las MPS y en la actualidad es utilizado como prueba diagnóstica preliminar. Las pruebas cualitativas incluyen la pre-

cipitación de GAGs con albúmina ácida, bromuro de cetiltrimetilamonio o cloruro de cetilpiridinio, las cuales pueden ser utilizadas en métodos cuantitativos turbidimétricos cuando los valores son corregidos de acuerdo con la concentración de creatinina y la edad del paciente, reduciéndose el número de falsos negativos o positivos (43). Sin embargo, la cuantificación turbidimétrica con cloruro de cetilpiridinio presenta baja sensibilidad en muestras de pacientes con MPS IV A (44). Uno de los métodos más usados para la detección y cuantificación de GAGs en orina es la prueba colorimétrica con azul de dimetilmileno, el cual presenta una sensibilidad cercana al 100%, una especificidad alrededor del 90% y la capacidad de permitir el diagnóstico de pacientes MPS I, III y IV, los cuales no son fácilmente diagnosticados por los otros métodos turbidimétricos (44, 45). Aunque la cuantificación turbidimétrica de GAGs en orina ofrece un tamizaje efectivo para muchas MPS, los niveles de GAGs en pacientes MPS IVA están próximos al rango de normalidad y disminuyen con la edad, dificultando el diagnóstico de estos pacientes (46). Esto hace que sea necesario el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico más sensibles para MPS IVA. Los GAGs en orina pueden ser identificados cualitativamente por medio de separación electroforética en soluciones tampón de barbitona, acetato de bario, acetato cúprico o sulfato de zinc (43).

En general, el diagnóstico definitivo de las MPS se establece por determinación de la actividad enzimática. Para MPS IVA la actividad GALNS es determinada en leucocitos y fibroblastos empleando el sustrato artificial fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido-6-sulfato. La reacción requiere la acción secuencial de las enzimas GALNS y β -galactosidasa para la liberación del compuesto fluorogénico 4-metilumbeliferona (Figura 3). En pacientes MPS IV A con fenotipos severos la actividad GALNS en leucocitos es inferior al 5% de los valores encontrados en individuos no afectados, mientras

que en fibroblastos la actividad se encuentra por debajo del 1% (47). En pacientes con fenotipos atenuados la actividad enzimática pueden variar desde 1,2% hasta 37% de los valores normales (48), y en heterocigotos está en un rango entre 40 y 70% (47). El diagnóstico prenatal puede ser realizado en líquido amniótico o vellosidades coriónicas (49). Recientemente se reportó la validación del método de cuantificación de actividad enzimática GALNS en muestras de sangre en papel de filtro (50). Aunque este método requiere un periodo de incubación mayor que el empleado con el método estándar, presenta una alta sensibilidad y especificidad permitiendo la identificación de pacientes MPS IV A.

Debido a que la MPS IV A es la única MPS en donde el metabolismo de QS se encuentra alterado, este GAG constituye un marcador potencial para el diagnóstico de la enfermedad. Tomatsu *et al.* (46), desarrollaron una prueba de ELISA empleando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente QS, para su cuantificación en sangre y orina. Los resultados mostraron que la concentración de QS en pacientes MPS IV A e individuos no afectados varía en relación con la edad, mostrando un pico de entre los cinco y diez años de vida el cual disminuye lentamente hasta los 20 años, momento en el cual los valores se estabilizan. Sin embargo, los valores de QS en sangre son significativamente mayores en pacientes MPS IV A que en individuos no afectados. En orina el pico de excreción se logra durante los primeros 5 años de vida, disminuyendo lentamente hasta los 12-13 años y marcadamente a partir de este punto hasta estabilizarse después de los 20 años. Al igual que en sangre, los valores de QS en orina de pacientes MPS IV A se encuentran significativamente elevados, comparados con los valores de individuos no afectados.

Empleando el concepto de la cuantificación de GAGs en fluidos biológicos como método diagnóstico, se ha desarrollado un método basado en la determinación de disacáridos derivados del quera-

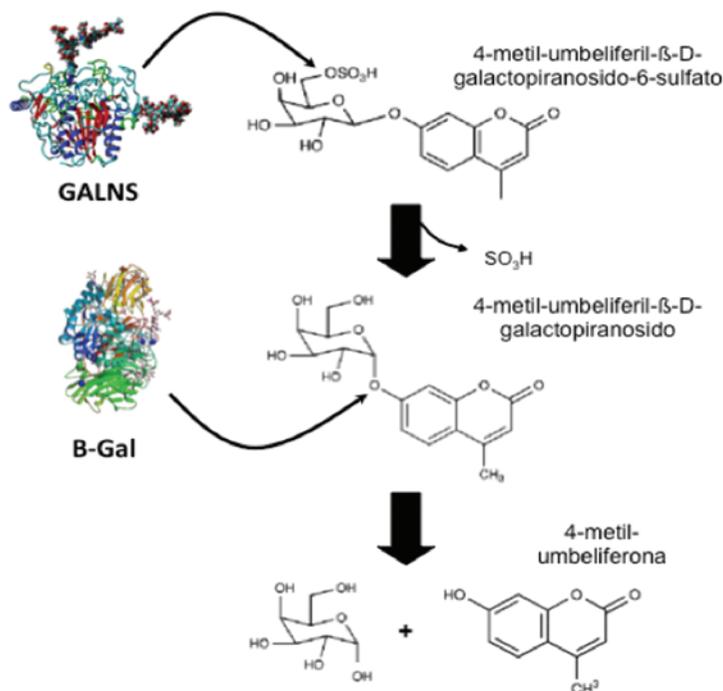


Figura 3. Reacción enzimática para cuantificación de GALNS.

La determinación de la actividad enzimática de GALNS se realiza con el sustrato artificial fluorogénico 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido-6-sulfato, en un proceso que involucra la acción secuencial de GALNS y de la β-galactosidasa (B-Gal) para liberar el fluorógeno 4-metilumbeliferona.

tán, heparán y dermatán sulfato por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) (51, 52). Con esta metodología se observó un aumento en los disacáridos derivados de QS en muestras de pacientes MPS IVA, comparado contra los valores obtenidos en individuos no afectados. Este método representa una herramienta importante para la implementación de pruebas de tamizaje neonatal en las MPS que permitan un diagnóstico sensible, así como el inicio de terapia a temprana edad (53).

Otra estrategia desarrollada para el diagnóstico de pacientes MPS IVA consiste en la cuantificación de la enzima GALNS en fibroblastos, plasma o sangre en papel de filtro empleando anticuerpos monoclonales específicos para la enzima (54). Basado en el hecho de que las mutaciones sobre

el gen *GALNS* tienen un efecto directo sobre la estabilidad y plegamiento de la proteína, este método permite identificar pacientes MPS IVA con base en la disminución de la cantidad de enzima tanto en plasma como en muestras de papel de filtro (54). De forma similar, en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo hemos desarrollado en huevos de gallina anticuerpos IgY policlonales epitope-específicos anti-GALNS (55), los cuales podrían ser empleados para el desarrollo de estrategias diagnósticas similares.

MODELOS ANIMALES

A diferencia de algunas enfermedades de depósito lisosomal que cuentan con modelos animales naturales (56), para la MPS IVA no se han identificado modelos animales espontáneos que

compartan las características bioquímicas o clínicas de la enfermedad. Por tal motivo fue necesario el desarrollado modelos murinos *knock-out* o *knock-in*,

que se han empleado en la evaluación de las estrategias de terapia génica y reemplazo enzimático.

Tabla 1. Principales características de los modelos murinos de MPS IVA.

	Knock-out (MKC) Galns -/- (58)	Tolerante (MTOL) Galns^{tm(hC79S-mC76S)slu} (59)	Knock-in (C2) Galns^{tm(mC76S)slu} (60)
Mutación	Delección en intron 1 y exón 2	pC76S en el gen murino y pC79S en el ADNc de GALNS humana	pC76S
Proteína	No síntesis de proteína	Las enzimas murina y humana son sintetizadas en la forma inactiva por mutación en el sitio activo	Galns murina es sintetizada pero es inactiva por mutación en el sitio activo
Actividad GALNS (% nivel normal)			
	2,6	2,5	3,0
Hígado	1,4	1,6	1,2
Bazo	0,04	2,2	4,0
Riñón	5,1	4,8	10,0
Cerebro	3,9	4,6	5,4
Hueso	4,1	2,0	2,1
Médula ósea	0	0 (plasma)	2,6
Actividad de otras enzimas lisosomales	β-GAL, a-GAL, GUSB y β-HEX están levemente aumentadas.	Valores de IDS, ARSB y sulfamidasa están entre el 5 -30 % de los valores normales.	IDS, ARSB y sulfamidasa ligeramente aumentadas.
Histopatología	Almacenamiento en células sinusoidales (hígado), células epiteliales del glomérulo, válvulas cardiacas, neuronas del hipocampo y células gliales neocorticales. Ausencia de almacenamiento en osteoblastos, osteocitos o condrocitos.	Adicional a lo observado en el modelo MKC se observa almacenamiento en médula ósea, osteoblastos, osteocitos, condrocitos y tejido conectivo, Placa de crecimiento del hueso con estructura irregular, con una capa proliferativa mas corta y una hipertrofica gruesa con pérdida de la organización celular	Almacenamiento en células del sistema macrofágico. Cúmulos en células de Kupffer y del bazo en menor proporción que en el modelo tolerante. Mínima vacuolización en válvulas cardiacas. Reducida cantidad de GAGs en células epiteliales del glomérulo. Ausencia de cúmulos en hepatocitos y células del túbulo renal Menor almacenamientos en neuronas corticales y del hipocampo que en el modelo tolerante Ausencia de almacenamiento en osteoblastos y osteocitos. Reducido almacenamiento en condrocitos.
GAGs en orina	GAGs totales entre 2 y 6 veces los valores normales. QS en orina normal.	GAGs totales entre 2 y 6 veces los valores normales. QS en orina normal.	GAGs totales normales QS en orina no reportado.

La clonación y caracterización del gen murino *Galns* (57), permitió el desarrollo de tres modelos animales para MPS IVA. Las principales características de los tres modelos se encuentran resumidas en la Tabla 1.

El primer modelo desarrollado fue el ratón Morquio *Knock-out* (MKC) producido por delección en el intrón 1 y el exón 2 (58). Posteriormente se construyó el modelo tolerante a la enzima humana

(MTOL), el cual porta una mutación puntual en el sitio activo del gen murino (pC76S) y una copia del ADNc humano con una mutación en el sitio activo (pC79S) (59). Finalmente se desarrolló un modelo murino *knock-in* portando una mutación puntual en el sitio activo del gen murino *Galns* (C2) (60). Los tres modelos muestran valores de actividad GALNS inferiores al 10% de los valores normales y cúmulos de GAGs principalmente en células del sistema fagocitario. A pesar que los tres modelos comparten algunas de las características histológicas observadas en pacientes con MPS IV A, los modelos animales son fenotípicamente indistinguibles de los ratones normales, no se observa el compromiso óseo presente en los pacientes con MPS IV A y presentan fertilidad, peso y tasa de mortalidad similar a la observada en animales silvestres. Este hallazgo se encuentra relacionado con la ausencia de QS en tejido esquelético (QS II) de ratón (61).

TRATAMIENTO

Actualmente no existen medicamentos específicos para el tratamiento de la MPS IV A, y la mayoría de las manifestaciones son manejadas mediante tratamiento farmacológico paliativo o correcciones quirúrgicas (3). En cuanto al manejo farmacológico se emplean principalmente antiinflamatorios no esteroideos para el dolor de las articulaciones, antibióticos para las infecciones pulmonares y oxígeno para el manejo del compromiso pulmonar y la apnea obstructiva del sueño (3).

Alrededor de los 5 años de edad los pacientes son comúnmente sometidos a tonsilectomía y adenoidectomía, para prevenir infecciones y dificultades respiratorias (3). Debido a los problemas de columna vertebral, principalmente la hipoplasia del proceso odontoideo y la cifosis, los pacientes con frecuencia son sometidos a descompresión del canal espinal y fusión cervical, lo cual tiene un impacto positivo importante en su calidad de vida

(36, 37, 39). Apesar que no existe un concepto claro sobre el momento adecuado para su realización, estas cirugías son realizadas en promedio alrededor de los 10 años de edad (3). A esta misma edad aproximadamente el 30% de los pacientes son sometidos a cirugías en la cadera, rodillas y fémur, para corregir problemas de marcha y enderezar la posición de las extremidades inferiores (3, 33, 62). Independiente de la operación realizada, se debe prestar especial atención durante la anestesia debido a la dificultad para la intubación y los problemas respiratorios; así como a la inestabilidad cervical que puede llevar a parálisis o muerte por subluxación atlanto-axial (63).

El trasplante de médula ósea ha probado tener importantes beneficios en pacientes con MPS I, II, III y VI, aunque con resultados variables (64). Adicional a la dificultad de conseguir un donante compatible y al elevado riesgo de complicaciones, el trasplante de médula ósea en pacientes MPS IVA tiene un efecto limitado sobre las anomalías cardíacas, visuales y esqueléticas; (8). Sin embargo, recientemente se reportaron los resultados de un paciente MPS IV A luego de cinco años de un trasplante alogénico de médula ósea, observando aumento de la actividad GALNS en linfocitos, mejoramiento de la actividad motora, disminución de las complicaciones respiratorias y visuales y aumento de la densidad ósea (1).

Debido a los resultados observados en otras enfermedades de depósito lisosomal (EDL) y a la ausencia de complicaciones sobre el sistema nervioso central, la MPS IV A es una enfermedad susceptible de ser tratada por alternativas como terapia de reemplazo enzimático (TRE), terapia génica y terapia de reducción de sustrato (TRS) (Figura 4). Mientras la TRE cuenta con ensayos preclínicos y clínicos, la terapia génica aun se encuentra en etapas preclínicas y la TRS aun no ha sido evaluada para MPS IV A.

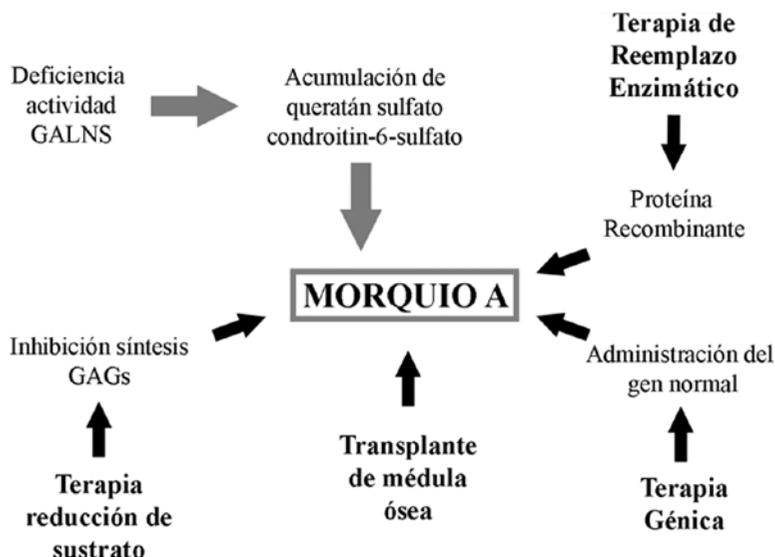


Figura 4. Estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Morquio A.

Las principales opciones de tratamiento se basan en la entrega de células madre de individuos no afectados (Trasplante de Médula Ósea), la administración de una proteína recombinante (Terapia de Reemplazo Enzimático), el uso de vectores virales o no virales para mediar la entrega del gen normal a células afectadas para que estas produzcan cantidades terapéuticas de la proteína (Terapia Génica), o la inhibición, total o parcial, de la síntesis de los sustratos, limitando la acumulación de estos (Terapia de Reducción de Sustrato).

Terapia de reemplazo enzimático

Los beneficios clínicos de la TRE han sido demostrados para varias enfermedades de depósito lisosomal, incluyendo Gaucher, Fabry, Pompe, MPS I, II y VI (65, 66), en donde se ha logrado una mejoría de las manifestaciones somáticas y en la calidad de vida de los pacientes (65, 66). Para el caso de la MPS IV A se han realizado ensayos *in-vitro* e *in-vivo* con enzimas recombinantes producidas en células CHO o en *Escherichia coli* (9-12, 55). Los primeros resultados, en uno de modelos murinos MPS IV A, mostraron que tras la infusión de una enzima recombinante producida en células CHO, la actividad se incrementó principalmente en hígado, mientras que en otros tejidos como hueso, pulmón y riñón, los valores fueron significativamente menores que los observados en ratones normales. El análisis de biodistribución mostró que 24 horas postinyección la enzima fue

encontrada principalmente en hígado y en una menor cantidad en cerebro, pulmón, corazón, bazo y riñón. Un hallazgo importante fue que en hueso la enzima fue encontrada en la región mineralizada y solo una pequeña cantidad en la placa de crecimiento (12).

El efecto de la infusión de la enzima recombinante GALNS sobre la enfermedad fue evaluado por infusión semanal de la enzima durante 12 semanas en ratones adultos MTOL (9). En este estudio se evaluó el efecto de dos enzimas recombinantes: GALNS nativa y GALNS producida por coexpresión con SUMF1 (SUMF1-GALNS). Ambas enzimas mostraron un tiempo de vida media en plasma similar, permaneciendo detectables en sangre por 30 minutos. Después de 12 semanas de tratamiento las dos enzimas permitieron una reducción completa de GAGs en hígado, bazo y células sinusoides en médula ósea. En ligamentos y tejido conectivo alrededor del cartílago articular,

así como en osteoblastos y osteocitos, se observó una leve disminución en los cúmulos de GAGs sólo con SUMF1-GALNS. En la placa de crecimiento no se observó mejoría de la estructura y los GAGs no fueron eliminados completamente. La cuantificación de QS en plasma por LC-MS/MS mostró una disminución a partir de la tercer semana de tratamiento, alcanzando valores similares a los encontrados en animales normales al cabo de las 12 semanas (9).

Aunque estos estudios mostraron el potencial de la TRE para el tratamiento de la MPS IV A aún era necesario aumentar la distribución de la enzima en hueso, específicamente hacia la placa de crecimiento y lograr la recuperación de la estructura de este tejido. Por este motivo, en la Universidad de Saint Louis se diseñó una enzima GALNS recombinante portando una señal de direccionamiento a hueso conformada por un péptido cargado negativamente ubicado en el extremo N-terminal de la proteína. La adición de la señal de direccionamiento a hueso permitió aumentar la vida media de la enzima en sangre, así como su afinidad por hueso, produciendo una disminución significativa de los cúmulos de GAGs en hueso, médula ósea y válvulas cardíacas (11). Sin embargo, Dvorak-Ewell *et al.* mostraron la posibilidad de exponer la enzima a hueso, específicamente a la placa de crecimiento, sin la necesidad de adicionar la señal de direccionamiento (10). La razón por la cual esta enzima es capaz de llegar a la placa de crecimiento es desconocida, sin embargo, los ensayos no fueron realizados con el modelo murino de la enfermedad, por lo que los beneficios de esta enzima sobre el fenotipo de la enfermedad son desconocidos.

Recientemente, el *Instituto de Errores Innatos del Metabolismo* mostró la posibilidad de producir en *E. coli* una enzima GALNS recombinante activa (55). A pesar que *E. coli* no realiza *N*-glicosilaciones, si tiene la capacidad de realizar la modificación de cisteína a formilglicina para la activación de la enzima (67). De esta forma, estos resultados sugirieron que:

(i) las *N*-glicosilaciones parecen no ser necesarias para la producción de una proteína recombinante activa, y (ii) la enzima FGE procariota es capaz de reconocer y activar una sulfatasa humana mostrando el alto grado de conservación de este mecanismo celular (55). La purificación y caracterización *in-vitro* de la proteína producida en *E. coli* permitió demostrar que las *N*-glicosilaciones no son necesarias para la producción de una proteína activa o para su estabilidad, pero si para mediar la captura celular de la proteína (68). Aunque aun es necesario ampliar estos estudios, estos resultados muestran el potencial de esta enzima recombinante en el desarrollo de una nueva estrategia de TRE para MPS IV A.

Terapia génica

Según la Sociedad Americana de Terapia Génica y Celular, la terapia génica se puede definir como el conjunto de estrategias que modifican la expresión de un gen o que corrigen genes anormales, mediante la administración de un ácido nucleico (ADN o ARN) específico (69).

Las MPS son excelentes candidatas para su tratamiento por terapia génica por las siguientes razones: (i) teóricamente solo el 10% de la actividad enzimática permite pasar de un fenotipo severo a uno atenuado, pues valores cercanos a este porcentaje, e incluso inferiores, son encontrados en pacientes con las variantes medias y atenuadas de la enfermedad (70), (ii) no es necesaria una regulación estricta del transgen, debido a que los genes de las enzimas lisosomales presentan expresión constitutiva (56), (iii) es posible realizar la corrección del defecto en células no transducidas por el vector gracias al mecanismo de corrección cruzada mediada por el receptor de manosa-6-fosfato (71), (iv) ensayos preclínicos en diferentes modelos animales (ratón, rata, perro y gato) han permitido niveles enzimáticos terapéuticos hasta por 1,5 años en ratón (72) y 3 años en perros (73), con importantes correcciones bioquímicas y

clínicas, y (v) en las enfermedades producidas por la deficiencia de una sulfatasa, la coexpresión con SUMF1 ha permitido aumentos significativos en la actividad de sulfatasa recombinante (74, 75). Diferentes vectores han sido empleados para realizar la transferencia génica en modelos animales de EDL, siendo los más frecuentes los lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados (13, 76, 77).

El primer trabajo de transferencia génica para la MPS IVA fue el desarrollado por Toietta *et al.* (17), en el que se empleó un vector retroviral portando el gen de *GALNS* para transducir fibroblastos y linfocitos de sangre periférica de individuos normales y pacientes Morquio A, así como queratinocitos humanos, mioblastos de ratón y sinoviocitos de conejo. El uso de este vector permitió obtener valores de actividad enzimática entre 5 y 50 veces por encima de los encontrados en células normales, así como una reducción de los GAGs a niveles iguales o menores a los encontrados en células normales.

Durante los últimos años el *Instituto de Errores Innatos del Metabolismo* en colaboración con la *Universidad de Saint Louis* (USA), ha trabajado en el desarrollo de una estrategia de terapia génica para el tratamiento de la enfermedad de Morquio A. Para este objetivo se seleccionaron vectores derivados de virus adenoasociados (AAV). Los AAV son virus no envueltos pertenecientes a la familia *Parvoviridae* género *Dependovirus*, constituidos por un genoma de ADN de cadena sencilla de 4,7 kb (78). Dentro de los diferentes vectores empleados en terapia génica, los vectores derivados de AAV han ganado importancia durante los últimos años por presentar un buen perfil de seguridad, no estar asociados con la generación de fuertes efectos adversos, y bajo ciertas condiciones, permitir la expresión del transgen por periodos prolongados de tiempo (78-80). En el caso de los MPS estos vectores han sido empleados en modelos animales de MPS I, II, IIIA, IIIB, VI y VII (13, 76).

Los primeros trabajos para el uso de vectores AAV en MPS IV A estuvieron encaminados al establecimiento y apropiación de las técnicas de clonación y producción de los vectores. En esta etapa se demostró el aumento de la actividad enzimática en fibroblastos MPS IV A y células HEK293 transducidas con los vectores AAV. Este estudio constituyó el primer trabajo de transferencia génica utilizando vectores virales en el país, y mostró la posibilidad de realizar la corrección del defecto genético en pacientes con MPS IV A empleando vectores AAV (16). Sin embargo, por esa época algunas publicaciones comenzaron a mostrar las limitaciones del uso de promotores virales para realizar la expresión del gen de interés (81). Debido a que el vector previamente construido empleaba el promotor del citomegalovirus (CMV), en el siguiente trabajo se enfocó en el estudio de promotores no virales que permitieran obtener niveles de expresión similares al obtenido con el promotor CMV, y a la evaluación de los mismos en cultivos celulares y en el modelo murino de la enfermedad.

La primera parte del trabajo comparó *in vitro* el efecto de promotor del CMV con los promotores eucarióticos del factor de elongación 1α (EF1) y de la $\alpha 1$ antitripsina humana (AAT) (14). Los resultados mostraron que los promotores eucarióticos (AAT y EF1) permitían niveles enzimáticos similares a los obtenidos con el promotor CMV, sin observar una regulación negativa del promotor CMV, lo cual difería de los reportes de silenciamiento de este promotor observados por nosotros y otros grupos de investigación (15, 81). Sin embargo, esos estudios empleaban vectores retrovirales, adenovirales o plásmidos (82-85), y hasta ese momento no se había realizado un estudio detallado del silenciamiento del promotor CMV en el contexto de un vector AAV2. De esta manera los resultados de esta primera etapa sugirieron, por primera vez, la existencia de un mecanismo inducido por el vector AAV que evitara el silenciamiento del promotor CMV, lo que podría explicar los reportes en los que el uso del promotor

CMV y un vector AAV han permitido la expresión de diferentes genes por periodos hasta de un año y medio en ratones (81, 84, 86, 87).

Otro de los factores importantes en el desarrollo de una terapia génica para la enfermedad de Morquio A es la coexpresión con SUMF1. En este aspecto se logró demostrar que la coexpresión con SUMF1, independiente del promotor utilizado, permitía un aumento hasta de 4 veces en la actividad enzimática en el lisado celular (14). Por otro lado, la actividad en el medio de cultivo fue detectada exclusivamente en células coexpresando GALNS y SUMF1, mostrando la importancia de la coexpresión con SUMF1 para lograr que la enzima producida sea exportada y pueda ser capturada por las células no transducidas. Un hallazgo importante, y no reportado hasta ese momento, fue la variación del efecto de la coexpresión con SUMF1 observada en diferentes tipos celulares. Mientras en células HEK293 la actividad en el medio de cultivo era detectada con relaciones GALNS: SUMF1 1:1, en fibroblastos era necesario utilizar relaciones GALNS: SUMF1 1:2 para lograr detectar la enzima en el medio de cultivo; mientras que en condrocitos murinos el aumento fue menor que el observado en células HEK293 y fibroblastos. En resumen, estos resultados mostraron la importancia de la coexpresión con SUMF1 y de la selección adecuada de la relación GALNS: SUMF1 dependiendo del tipo de células transducidas, para lograr niveles terapéuticos de actividad enzimática.

En la siguiente etapa se realizó la evaluación *in-vivo* de la terapia mediante la administración del vector AAT-GALNS, o la coadministración de AAT-GALNS y CMV-SUMF1, en ratones MPS IVA (Tabla 2) (88). Al cabo de 12 semanas, la administración del vector AAT-GALNS permitió niveles de actividad enzimática en plasma del 8%, los cuales llegaron a ser cercanos al 20% en animales coinyectados con los vectores AAT-GALNS y CMV-SUMF1. En tejidos los mayores niveles se observaron en

hígado, con un 21 y 37% de los valores normales, para animales AAT-GALNS y AAT-GALNS: CMV-SUMF1, respectivamente. En este último grupo de animales, se destacó el aumento significativo de la actividad enzimática en corazón y hueso (30 y 33% de los valores normales, respectivamente), dos de los tejidos más afectados tanto en el modelo murino como en los pacientes con MPS IVA, mostrando la ventaja de la coadministración con SUMF1. Otro hallazgo importante fue el hecho de que no se observó silenciamiento del promotor CMV durante las 12 semanas del estudio, ratificando lo observado en los ensayos *in vitro* y sugiriendo nuevamente que el silenciamiento de este promotor puede estar estrechamente ligado al tipo de vector utilizado. Este trabajo constituyó la primer evidencia *in vivo* de la posibilidad de realizar la corrección del defecto genético en la enfermedad de Morquio A (88).

Durante el desarrollo de las etapas anteriores se observó que los vectores AAV no poseían afinidad por tejido óseo, limitando así la entrega del gen de interés a este tejido. El hueso es un tejido de soporte vascularizado consistente en células y una matriz extracelular mineralizada. Cerca de 100 millones de personas sufren a nivel mundial de enfermedades relacionadas con problemas óseos, incluyendo osteoporosis, cáncer, osteoartritis, artritis inflamatoria y algunos errores innatos del metabolismo (89). Por lo tanto, un agente terapéutico diseñado para el tratamiento de estas enfermedades debe ejercer principalmente su actividad farmacológica en este tejido. La hidroxiapatita es el principal componente inorgánico del hueso y se encuentra presente de forma exclusiva en este tejido, por lo que constituye un blanco importante para el direccionamiento de agentes terapéuticos a tejido óseo (90). Tomando como base la estrategia de direccionamiento a hueso empleada para la enzima GALNS recombinante (11), la tercera fase del proyecto consistió en adaptar esta tecnología para el direccionamiento a hueso de un vector AAV. Para este fin, se construyó un

vector AAV portando la señal de direccionamiento a hueso en su cápside, con el objetivo de alterar

el tropismo natural del vector y permitir su biodistribución a hueso (Figura 5).

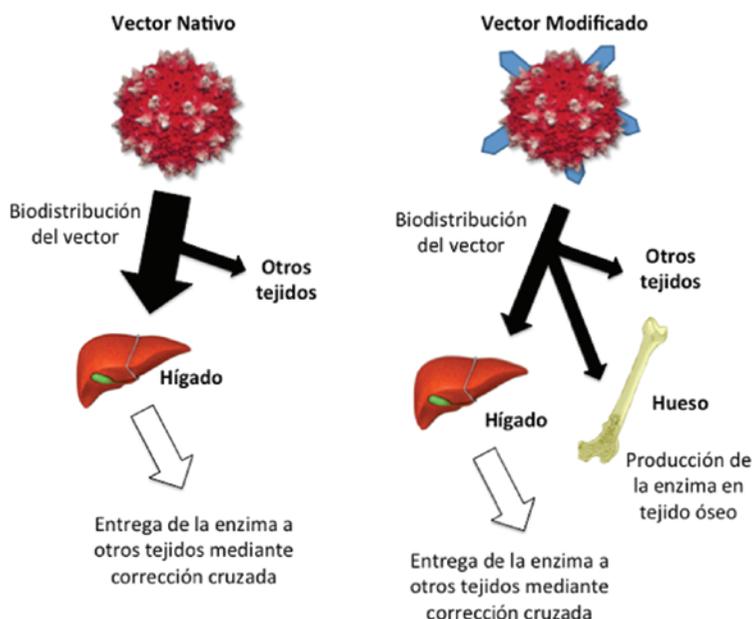


Figura 5. Vector adenoasociado con señal de direccionamiento a hueso.

La señal de direccionamiento a hueso fue insertada en la cápside del vector adenoasociado nativo para aumentar la biodistribución del vector a hueso. Mientras con el vector nativo la enzima llega a tejidos no transfectados (incluyendo hueso) mediante el mecanismo de corrección cruzada, con el vector modificado las células óseas son capaces de producir su propia enzima.

La cápside de los AAV está formada por las proteínas VP1, VP2 y VP3 (Figura 6a) que se encuentran en una relación 1:1:10. Estudios de mutagénesis han mostrado que existen diferentes posiciones dentro de las proteínas de la cápside en las que se puede realizar la inserción de péptidos sin alterar significativamente los procesos de empaquetamiento y transducción (91, 92). Dentro de estas posiciones, el extremo N-terminal de la proteína VP2 representa uno de los sitios más estudiados debido a que no se afecta el sitio de unión utilizado por el virus para entrar a la célula (93). A pesar que un gran número de estudios han mostrado los beneficios de realizar la modificación de la cápside del vector para aumentar su afinidad por células pulmonares, endoteliales, islas pancreáticas, tejido

vascular, músculo, miocardio o células cancerígenas (93), hasta el momento no se había evaluado el direccionamiento de un vector AAV a hueso.

La inserción de la señal de direccionamiento a hueso se realizó en el extremo N-terminal de la proteína VP2 (Figura 6b) mediante mutagénesis sitio dirigida en el plásmido de empaquetamiento. Luego de comprobar la correcta inserción de la secuencia codificando para la señal de direccionamiento, el vector fue evaluado tanto *in-vitro* como *in-vivo* para comprobar su capacidad de empaquetamiento, transducción, afinidad por hidroxiapatita, biodistribución y expresión. *In-vitro*, el vector modificado mostró una afinidad del 100% por la hidroxiapatita, a diferencia de lo observado con el vector nativo, el cual presentó

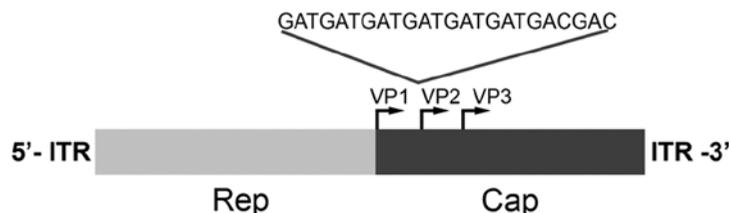


Figura 6. Inserción de la señal de direccionamiento a hueso en la cápside del vector.

El genoma de los vectores AAV esta conformado por el gen Rep, que codifica para las proteínas Rep encargadas de la regulación de los procesos de replicación, empaquetamiento e integración, y el gen Cap que codifica para las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, cuya diferencia radica en el codón de inicio empleado. La secuencia de ADN codificando para la señal de direccionamiento a hueso fue insertada inmediatamente después del codón de inicio de VP2, dentro del plásmido de empaquetamiento.

un porcentaje de afinidad inferior al 1%. Los estudios en cultivos celulares mostraron que la presencia de la señal de direccionamiento no afectó la capacidad de transducción del vector, mientras que en los ensayos *in-vivo* el vector con la señal de direccionamiento a hueso permitió detectar el transgen en concentraciones hasta 300 veces más elevadas que las observadas con el vector nativo. *In-vivo* el vector modificado fue capaz de liberarse de la hidroxipatita y transducir las células adyacentes permitiendo

valores de actividad enzimática en hígado, corazón, cerebro, médula ósea y hueso, mayores que los observados en animales inyectados con el vector sin modificar (Tabla 2) [(94) y datos sin publicar]. Estos resultados muestran el potencial de este vector modificado como herramienta importante no solo para el tratamiento de la MPS IV A, sino también para el tratamiento de otras enfermedades con problemas óseos como artritis, hipofosfatasa y errores innatos del metabolismo con compromiso óseo.

Tabla 2. Actividad GALNS en plasma y tejidos postinyección de vectores AAV en el modelo murino tolerante de MPS IV A. Los valores se muestran como el porcentaje de actividad con respecto a los valores de actividad observados en animales silvestres (C57Bl/6)

Tejido	AAV-GALNS1 (12 semanas)	AAV-GALNS: AAV-SUMF12 (12 semanas)	BT/AAV-GALNS3 (2 semanas)
Plasma	8,5	19,4	NR
Hígado	21,9	36,6	24,3
Bazo	4,5	5,4	3,2
Riñón	3,2	3,1	1,8
Pulmón	4,2	4,1	3,0
Corazón	6,5	30,6	61,8
Cerebro	4,0	9,1	35,8
Médula ósea	2,0	10,4	13,8
Hueso	0,2	33,3	41,9

¹ Vector con cápside sin modificar

² Los vectores AAV-GALNS y AAV-SUMF1 fueron coadministrados en una relación 1:2. Estos vectores portan la cápside sin modificar.

³ Vector modificado portando cápside con señal de direccionamiento a hueso.

NR = No realizado

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Durante los últimos 30 años se han realizado importantes avances en el diagnóstico y tratamiento para la enfermedad de Morquio A. En la última década, mediante la colaboración con los Drs. Shunji Tomatsu y Adriana M. Montaña, colombiana radicada en la ciudad de Saint Louis (USA), un número importante de investigadores colombianos han participado activamente en la identificación de mutaciones, evaluación de nuevas herramientas diagnósticas, construcción de modelos animales y en el desarrollo de estrategias de terapia génica y de reemplazo enzimático. Sin embargo, aún es necesario profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad, el desarrollo e implementación de programas de tamizaje neonatal, el desarrollo de sistemas que permitan evitar el rechazo inmunológico de la proteína recombinante, la producción de la proteína recombinante en otros sistemas de expresión, y el desarrollo de alternativas terapéuticas basadas en estrategias de reducción u optimización de sustrato o el uso de chaperonas farmacológicas. En la actualidad estas estrategias se encuentran bajo evaluación, en las cuales investigadores colombianos siguen realizando aportes importantes que permitan seguir avanzando en el conocimiento de esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Pontificia Universidad Javeriana; la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República; el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias); y la Fundación Carol Ann (Organización Internacional Morquio) por sus aportes económicos para la realización de los diferentes proyectos de los cuales se derivan estos resultados. Igualmente expresan sus agradecimiento por el apoyo en la

construcción de vectores para terapia génica a Felipe Garcia, Mónica Gutierrez, María Andrea Rueda, Rocio Cuaspa y Eric Shelley; en el diagnóstico y estudio de mutaciones a Hugo Vega, Olga Yaneth Echeverri, Susana Vélez, Piedad Sarmiento e Inés Stella Morales; y en la producción de la enzima recombinante en *E. coli* a Ángela Mosquera, Ángela Espejo, Lina Lizaraso, Alexander Rodríguez y Oscar Sánchez.

REFERENCIAS

1. Tomatsu S, Montaña AM, Oikawa H, Smith M, Barrera L, Chinen Y, et al. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Jun 1;12(6):931-45.
2. Morquio L. Sur une forme de dystrophie osseuse familiale. *Bull Soc Pedat Paris*. 1929;27:145-52.
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 Inher Metab Dis*. 2007;30(2):165-74.
4. Mikles M, Stanton R. A review of Morquio syndrome. *Am J Orthop*. 1997;26(8):533-40.
5. Barrera L, Echeverri O, Espinosa E. Errores Innatos del Metabolismo. In: Correa J, Gómez J, Posada R, editores. *Fundamentos de Pediatría*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007. p. 356 - 96.
6. 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.
7. 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.
8. Ashworth JL, Biswas S, Wraith E, Lloyd IC. Mucopolysaccharidoses and the eye. *Surv Ophthalmol*. 2006 Jan-Feb;51(1):1-17.
9. Tomatsu S, Montaña 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(6):815-24.
10. Dvorak-Ewell M, Wendt D, Hague C, Christianson T, Koppaka V, Crippen D, et al. Enzyme replacement in a human model of mucopolysaccharidosis IVA in vitro and its biodistribution in the cartilage of wild type mice. *PLoS One*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010;5(8):e12194.

11. Tomatsu S, Montaña AM, Dung V, Ohashi A, Oikawa H, Oguma T, et al. Enhancement of drug delivery: Enzyme-replacement therapy for murine Morquio A syndrome. *Mol Ther*. 2010;18(6):1094-102.
12. 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.
13. Ponder K, Haskins M. Gene therapy for mucopolysaccharidosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2007;7(9):1333-45.
14. Alméciga-Díaz C, Montaña AM, Tomatsu S, Barrera L. Adeno-associated virus gene transfer on Morquio A: effect of promoters and sulfatase-modifying Factor 1. *FEBS J*. 2010 September 2010;277(17):3608-19.
15. Alméciga-Díaz C, Rueda-Paramo M, Espejo A, Echeverri O, Montaña A, Tomatsu S, et al. Effect of Elongation Factor 1 α promoter and SUMF1 over in-vitro expression of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Mol Biol Rep*. 2009 September 2009;36(7):1863-70.
16. Gutierrez M, Garcia-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(3):448-59.
17. 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(16):2007-16.
18. Nakashima Y, Tomatsu S, Hori T, Fukuda S, Sukegawa K, Kondo N, et al. Mucopolysaccharidosis IV A: Molecular cloning of the human N-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene (GALNS) and analysis of the 5'-flanking region. *Genomics*. 1994;20:99-104.
19. Tomatsu S, Fukuda M, Masue K, Sukegawa T, Fukao A, Yamagishi T, et al. Morquio disease: isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;181:677-83.
20. Tomatsu S, Montaña A, Nishioka T, Gutierrez M, Peña O, Trandafirescu G, et al. Mutation and Polymorphism Spectrum of the GALNS Gene in Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum Mutat*. 2005;26:500-12.
21. Tomatsu S, Filocamo M, Orii KO, Sly WS, Gutierrez MA, Nishioka T, et al. Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A): identification of novel common mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene in Italian patients. *Hum Mutat*. 2004 Aug;24(2):187-8.
22. Tomatsu S, Dieter T, Schwartz IV, Sarmient P, Giugliani R, Barrera LA, et al. Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate. *J Hum Genet*. 2004;49(9):490-4.
23. Masue M, Sukegawa K, Orii T, Hashimoto T. N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in human placenta: purification and characteristics. *J Biochem*. 1991 Dec;110(6):965-70.
24. Sukegawa K, Nakamura H, Kato Z, Tomatsu S, Montaña AM, Fukao T, et al. Biochemical and structural analysis of missense mutations in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase causing mucopolysaccharidosis IVA phenotypes. *Hum Mol Genet*. 2000 May 22;9(9):1283-90.
25. Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes. *Faseb J*. 1987 Dec;1(6):462-8.
26. Roeser D, Preusser-Kunze A, Scgmidt B, Gasow K, Wittmann J, Dierks T, et al. A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:81-6.
27. 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 May 16;113(4):435-44.
28. 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(4):445-56.
29. Sly WS, Vogler C, Grubb JH, Levy B, Galvin N, Tan Y, et al. Enzyme therapy in mannose receptor-null mucopolysaccharidosis VII mice defines roles for the mannose 6-phosphate and mannose receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 10;103(41):15172-7.
30. Neufeld E, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3421-52.
31. Davison JE, Kearney S, Horton J, Foster K, Peet AC, Hendriksz CJ. Intellectual and neurological functioning in Morquio syndrome (MPS IVa). *J Inherit Metab Dis*. 2012 Jan 10.
32. Ohashi A, Montaña AM, Colon JE, Oguma T, Luisiri A, Tomatsu S. Sacral dimple: incidental findings from newborn evaluation. *Mucopolysaccharidosis IVA disease. Acta Paediatr. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 2009 May;98(5):768-9, 910-2.
33. Kanazawa T, Yasunaga Y, Ikuta Y, Harada A, Kusaka O, Sukegawa K. Femoral head dysplasia in Morquio disease type A. *Acta Orthop Scand*. 2001;72(1):18-21.
34. Montaña AM, Tomatsu S, Brusius A, Smith M, Orii T. Growth charts for patients affected with Morquio A Disease. *Am J Med Genet*. 2008;15(10):1286-95.

35. Northover H, Cowie R, Wraith J. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio syndrome): a clinical review. *J Inherit Metab Dis.* 1996;19(3):357-65.
36. Piccirilli C, Chaddock W. Cervical kyphotic myelopathy in a child with Morquio syndrome. *Child's Nerv Syst.* 1996;12:114-6.
37. Rigante D, Antuzzi D, Ricci R, Segni G. Cervical myelopathy in mucopolysaccharidosis type IV. *Clin Neuropathol.* 1999;18(2):84-6.
38. Dalvie S, Skinner J, Vellodi A, Noorden MH. Mobile thoracolumbar gibbus in Morquio type A: the cause of paraparesis and its management. *J Pediatr Orthop B.* 2001 Oct;10(4):328-30.
39. Ransford AO, Crockard HA, Stevens JM, Modagheg S. Occipito-atlanto-axial fusion in Morquio-Brailsford syndrome. A ten-year experience. *J Bone Joint Surg Br.* 1996 Mar;78(2):307-13.
40. Rolling I, Clausen N, Nyvad B, Sindet-Pedersen S. Dental Findings in three siblings with Morquio's syndrome. *Int J Paediatr Dent.* 1999;9:219-24.
41. Walker PP, Rose E, Williams JG. Upper airways abnormalities and tracheal problems in Morquio's disease. *Thorax.* 2003 May;58(5):458-9.
42. Pelley CJ, Kwo J, Hess DR. Tracheomalacia in an adult with respiratory failure and Morquio syndrome. *Respir Care.* 2007 Mar;52(3):278-82.
43. Pennock CA. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *J Clin Pathol.* 1976 Feb;29(2):111-23.
44. Mabe P, Valiente A, Soto V, Cornejo V, Raimann E. Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests. *Clin Chim Acta.* 2004 Jul;345(1-2):135-40.
45. de Jong JG, Wevers RA, Laarakkers C, Poorthuis BJ. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem.* 1989 Jul;35(7):1472-7.
46. Tomatsu S, Okamura K, Taketani T, Orii KO, Nishioka T, Gutierrez MA, et al. Development and testing of new screening method for keratan sulfate in mucopolysaccharidosis IVA. *Pediatr Res.* 2004 Apr;55(4):592-7.
47. van Diggelen O, Zhao H, Kleijer W, Janse H, Poorthuis B, Pelt Jv, et al. A fluorometric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A (MPS IVA). *Clin Chem Acta.* 1990;187(2):131-40.
48. Montañó AM, Sukegawa K, Kato Z, Carrozzo R, Di Natale P, Christensen E, et al. Effect of 'attenuated' mutations in mucopolysaccharidosis IVA on molecular phenotypes of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *J Inherit Metab Dis.* 2007 Oct;30(5):758-67.
49. Kleijer WJ, Geilen GC, Garritsen V, Huijmans JG, Los FJ, Voznyi YV, et al. First-trimester diagnosis of Morquio disease type A. *Prenat Diagn.* 2000 Mar;20(3):183-5.
50. Camelier MV, Burin MG, De MJ, Vieira TA, Marasca G, Giugliani R. Practical and reliable enzyme test for the detection of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Sep 18;412(19-20):1805-8.
51. Oguma T, Tomatsu S, Okazaki O. Analytical method for determination of disaccharides derived from keratan sulfates in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography/turbo-ionspray ionization tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 2007 Apr;21(4):356-62.
52. Martell LA, Cunico RL, Ohh J, Fulkerson W, Furneaux R, Foehr ED. Validation of an LC-MS/MS assay for detecting relevant disaccharides from keratan sulfate as a biomarker for Morquio A syndrome. *Bioanalysis.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Aug;3(16):1855-66.
53. Hintze JP, Tomatsu S, Fujii T, Montañó AM, Yamaguchi S, Suzuki Y, et al. Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry and sandwich ELISA for determination of keratan sulfate in plasma and urine. *Biomark Insights.* 2011;6:69-78.
54. Parkinson-Lawrence EJ, Muller VJ, Hopwood JJ, Brooks DA. N-acetylgalactosamine-6-sulfatase protein detection in MPS IVA patient and unaffected control samples. *Clin Chim Acta.* 2007 Feb;377(1-2):88-91.
55. Rodriguez A, Espejo AJ, Hernandez A, Velasquez OL, Lizaraso LM, Cordoba HA, et al. Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Escherichia coli* BL21. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2010 Nov;37(11):1193-201.
56. 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.
57. Montañó AM, Yamagishi A, Tomatsu S, Fukuda S, Copeland NG, Orii KE, et al. The mouse N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (*Galns*) gene: cDNA isolation, genomic characterization, chromosomal assignment and analysis of the 5'-flanking region. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 17;1500(3):323-34.
58. Tomatsu S, Orii K, Vogler C, Nakayama J, Levy B, Grubb J, et al. Mouse model of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency (*Galns*^{-/-}) produced by targeted disruption of the gene defective in Morquio A disease. *Hum Mol Genet.* 2003;12:3349-58.
59. Tomatsu S, Gutierrez M, Nishioka T, Yamada M, Tosaka Y, Grubb J, et al. Development of MPS IVA mouse (*Galnstm*(hC79S.mC76S)slu) tolerant to human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Hum Mol Genet.* 2005;14:3321-35.

60. Tomatsu S, Vogler C, Montaña A, Gutierrez M, Oikawa H, Dung V, et al. Murine model (Galns(tm(C76S)slu)) of MPS IVA with missense mutation at the active site cysteine conserved among sulfatase proteins. *Mol Genet Metab.* 2007;91(3):251-8.
61. Venn G, Mason RM. Absence of keratan sulphate from skeletal tissues of mouse and rat. *Biochem J.* 1985 Jun 1;228(2):443-50.
62. de Waal Malefijt MC, van Kampen A, van Gemund JJ. Total knee arthroplasty in patients with inherited dwarfism--a report of five knee replacements in two patients with Morquio's disease type A and one with spondylo-epiphyseal dysplasia. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2000;120(3-4):179-82.
63. Morgan K, Reahman M, Schwartz R. Morquio's syndrome and its anaesthetic considerations. *Paediatr Anaesth.* 2002;12:641-4.
64. Lange MC, Teive HA, Troiano AR, Bitencourt M, Funke VA, Setubal DC, et al. Bone marrow transplantation in patients with storage diseases: a developing country experience. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006 Mar;64(1):1-4.
65. Lim-Melia ER, Kronn DF. Current enzyme replacement therapy for the treatment of lysosomal storage diseases. *Pediatr Ann.* 2009 Aug;38(8):448-55.
66. Valayannopoulos V, Wijburg FA. Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology.* 2011 Dec;50 Suppl 5:v49-v59.
67. Landgrebe J, Dierks T, Schamidt B, Figura Kv. The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes. *Gene.* 2003;316:47-56.
68. Alméciga-Díaz C, Mosquera A, Leonardi F, Soto C, Rodríguez A, Lizaraso L, et al. Production and characterization of a recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *E. coli* BL21. *Mol Gen Metab.* 2011;102:S5.
69. American Society of Gene and Cell Therapy. 2007 [cited 2012 Enero 11 2012]; Available from: <http://www.asgt.org>.
70. Cheng S, Smith A. Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders. *Gene Ther.* 2003;10:1275-81.
71. Hodges BL, Cheng SH. Cell and Gene-Based Therapies for the Lysosomal Storage Diseases. *Curr Gen Ther.* 2006;6:227-41.
72. 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(3):478-91.
73. 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.
74. 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(2):305-12.
75. Fraldi A, Hemsley H, Crawley A, Lombardi A, Lau A, Sutherland L, et al. Functional correction of CNS lesions in MPS-IIIa mouse model by intracerebral AAV-mediated delivery of *sulfamidase* and SUMF1 genes. *Hum Mol Genet.* 2007;16(22):2693-702.
76. Seregin SS, Amalfitano A. Gene therapy for lysosomal storage diseases: progress, challenges and future prospects. *Curr Pharm Des.* [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011;17(24):2558-74.
77. Alméciga-Díaz C, Saénz H, Barrera L. Estado actual, consideraciones éticas y perspectivas de la terapia génica en errores innatos del metabolismo. *Rev Acad Colomb Cienc.* 2006;30(117):525-40.
78. Alexander I, Cunningham S, Logan G, Cristodoulou J. Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease. *Gene Ther.* 2008;15(11):831-9.
79. Wu Z, Asokan A, Samulski R. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther.* 2006 September 2006;14(3):316-27.
80. Carter B. Adeno-Associated Virus Vectors in Clinical Trials. *Hum Gene Ther.* 2005;16(5):541-50.
81. Papadakis E, Nicklin S, Baker A, White S. Promoters and control elements: Designing expression cassettes for gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2004;4(1):89-113.
82. Qin L, Ding Y, Pahud DR, Chang E, Imperiale MJ, Bromberg JS. Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum Gene Ther.* 1997 Nov 20;8(17):2019-29.
83. Prosch S, Stein J, Staak K, Liebenthal C, Volk HD, Kruger DH. Inactivation of the very strong HCMV immediate early promoter by DNA CpG methylation in vitro. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1996 Mar;377(3):195-201.
84. Collas P. Modulation of plasmid DNA methylation and expression in Zebrafish embryos. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(19):4454-61.
85. Brooks A, Harkins R, Wang P, Qian H, Liu P, Rubanyi G. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med.* 2004;6(4):395-404.
86. Toniatti C, Bujard H, Cortese R, Ciliberto C. Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther.* 2004;11(8):649-57.
87. Kim I, Józkwicz A, Piedra P. Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of

- helper-dependent adenoviral vector. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(23):13282-7.
88. Alméciga-Díaz C. Estudio del efecto de tres promotores y de la enzima activadora de sulfatasas, en una estrategia de terapia génica para la mucopolisacaridosis IVA. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
89. Masuya K, Teno N. Small molecules for bone diseases. Expert Opin Ther Pat. 2010 Apr;20(4):563-82.
90. Fujisaki J, Tokunaga Y, Takahashi T, Shimojo F, Kimura S, Hata T. Osteotropic drug delivery system (ODDS) based on bisphosphonic prodrug. I.v. effects of osteotropic estradiol on bone mineral density and uterine weight in ovariectomized rats. J Drug Target. 1998;5(2):129-38.
91. Shi W, Arnold G, Bartlett J. Insertional Mutagenesis of the Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2) Capsid Gene and Generation of AAV2 Vectors Targeted to Alternative Cell-Surface Receptors. Hum Gene Ther. 2001 September 2001;12:1697-711.
92. Wu P, Xiao W, Conlon T, Hughes J, Agbandje-McKenna M, Ferkol T, et al. Mutational Analysis of the Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2) Capsid Gene and Construction of AAV2 Vectors with Altered Tropism. J Virol. 2000 September 2000;74(18):8635-47.
93. Alméciga-Díaz C, Cuaspa R, Barrera L. Gene Delivery Systems: Tailoring Vectors to reach specific tissues. In: Yuan X, editor. Non-viral Gene Therapy. Rijeka, Croatia: InTech; 2011. p. 51-76.
94. Tomatsu S, Montaña AM, Alméciga-Díaz C, Barrera L, inventors; Saint Louis University, assignee. Delivery of therapeutic agents to the bone. USA patent US20100008979. 2010 January 14, 2010.

Fecha de recibido: Junio 21 de 2011
Fecha de aprobado: Junio 30 de 2012

Dirección para correspondencia:
Carlos Javier Alméciga Díaz
Instituto de Errores Innatos del Metabolismo
Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana
e-mail: cjalmechiga@javeriana.edu.co

Luis Alejandro Barrera
e-mail: abarrera@javeriana.edu.co