

**GLICOSILACION DE LAS ENZIMAS HUMANAS IDURONATO 2-SULFATO-SULFATASA (IDS) Y GALACTOSAMINA 6-SULFATO SULFATASA (GALNS)
EXPRESADAS EN *Pichia pastoris***

SILVIA ARACELY PARDO SÁNCHEZ



TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar por el título de

MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D.C.
Noviembre de 2010**

GLICOSILACION DE LAS ENZIMAS HUMANAS IDURONATO 2-SULFATO-SULFATASA (IDS) Y GALACTOSAMINA 6-SULFATO SULFATASA (GALNS) EXPRESADAS EN *Pichia pastoris*

SILVIA ARACELY PARDO SÁNCHEZ

APROBADO

Ingrid Schuler García, Ph.D
Decana Académica

Janeth Arias Palacios, M.Sc., M.Ed.
Directora Carreras de Microbiología

GLICOSILACION DE LAS ENZIMAS HUMANAS IDURONATO 2-SULFATO-SULFATASA (IDS) Y GALACTOSAMINA 6-SULFATO SULFATASA (GALNS) EXPRESADAS EN *Pichia pastoris*

SILVIA ARACELY PARDO SÁNCHEZ

APROBADO

Raúl Alberto Poutou, M.Sc., Ph.D.

Director

Homero Sáenz Suárez, M.Sc., Ph.D.

Co-director

Carlos Javier Alméciga Díaz, QF., Ph.D.

Jurado

DEDICATORIA

*A mi madre Jackelin,
Quien con su confianza y seguridad
Fue mi sostén en todo momento,
a mi esposo Juan,
compañero incondicional
a Juanita,
Regalo de Dios y amor de mi vida
Y a la memoria de Aracely,
Mi abuela.*

NOTA DE ADVERTENCIA

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

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

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	6
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
2.1. <i>Justificación</i>	13
2.2. <i>Planteamiento del problema</i>	14
3. MARCO TEÓRICO Y REFERENTES CONCEPTUALES.....	15
3.1. <i>Errores Innatos del Metabolismo</i>	15
3.2. <i>Mucopolisacaridosis Tipo II o Síndrome de Hunter</i>	17
3.3. <i>Manifestaciones Clínicas del Síndrome de Hunter</i>	18
3.4. <i>Iduronato 2-Sulfato-Sulfatasa Humana (IDS)</i>	20
3.5. <i>Mucopolisacaridosis Tipo IVA o Síndrome de Morquio A</i>	23
3.6. <i>Manifestaciones Clínicas del Síndrome de Morquio A</i>	24
3.7. <i>N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS)</i>	26
3.8. <i>Generalidades de las glicoproteínas</i>	28
3.9. <i>Clase de glicoproteínas</i>	29
3.10. <i>Proceso de glicosilación de proteínas</i>	30
3.11. <i>Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE)</i>	37
3.12. <i>Ventajas de la expresión de IDS y GALNS en Pichia pastoris</i>	40
3.13. <i>Glicosilación de proteínas en Pichia pastoris</i>	42
4. OBJETIVOS.....	46
4.1. <i>Objetivo General</i>	46
4.2. <i>Objetivos Específicos</i>	46
5.1. METODOLOGIA.....	47
5.1. <i>Criterios de Investigación</i>	47
5.1.2. <i>Formulación de la pregunta de investigación</i>	47
5.1.3. <i>Población Universal</i>	47
5.1.4. <i>Población de estudio</i>	47
5.1.5. <i>Intervención evaluada</i>	47
5.1.6. <i>Variable dependiente</i>	47
5.2. <i>Procedimiento para búsqueda de Información</i>	48
5.3. <i>Definición de criterios para la selección de artículos</i>	48
5.4. <i>Evaluación de artículos preseleccionados</i>	49

5.5. <i>Análisis de los resultados de la predicción computacional de la estructura terciaria de la IDS y GALNS</i>	50
5.5.1 <i>Análisis computacional basado en la estructura primaria de la IDS y GALNS</i> ..	50
5.5.2. <i>Modelos de estructura secundaria y terciaria y sitio activo</i>	50
5.5.3. <i>Cálculo de raíz media cuadrática</i>	51
6. RESULTADOS	53
6.1. <i>Selección de artículos</i>	53
6.2. <i>Glicosilación, secreción y nivel de expresión de las proteínas</i>	54
6.3. <i>Análisis de los resultados de la predicción computacional de la estructura terciaria de la IDS y GALNS</i>	63
6.3.1. <i>Análisis computacional basado en la estructura primaria de la IDS y GALNS</i> .	63
6.3.2. <i>Modelos de estructura secundaria y terciaria y sitio activo</i>	66
6.3.3. <i>Cálculo de raíz media cuadrática</i>	67
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70
8. CONCLUSIONES	76
9. RECOMENDACIONES	77
10. REFERENCIAS	78

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Algunos de los desordenes lisosomales causados por deficiencias enzimáticas reportados.....	16
TABLA 2. Publicaciones incluidas en las que se relaciona: N-glicosilación, peso molecular y el nivel de expresión de la proteína.	58
TABLA 3. Resultados de las predicciones computacionales de las moléculas IDSh y GALNSh.....	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Síntomas asociados a Síndrome de Hunter	19
FIGURA 2. Mecanismo de conversión de Cisteína a Formil-Glicina	21
FIGURA 3. Procesamiento de la IDS.....	22
FIGURA 4. Síntomas asociados a síndrome de Morquio A.....	25
FIGURA 5. Proceso de N-glicosilación de proteínas en células eucariotas.	34
FIGURA 6. Proceso de O-glicosilación de proteínas en células eucariotas.....	36
FIGURA 7. Estructura común de un N-oligosacárido sintetizado por <i>P. pastoris</i> ...	43
FIGURA 8. Metodología empleada para la búsqueda de la información	53
FIGURA 9. Secuencias aminoácidas de IDSh y GALNSh.	64
FIGURA 10. Perfiles de la IDSh y GALNSh.....	65

RESUMEN

Los Síndromes de Hunter y de Morquio A son Errores Innatos del Metabolismo (EIM) que pertenecen al grupo de las Mucopolisacaridosis (MPS) y son causados por la acumulación de macromoléculas no digeribles en los lisosomas conocidas como Glicosaminoglicanos (GAGs) que pueden hacer parte del tejido conectivo o estar presentes como carbohidratos en la superficie celular y sus funciones principales incluyen la interacción celular y la respuesta a estímulos exteriores y su acumulación resulta en difusiones celulares, en los tejidos y órganos. El Síndrome de Hunter se caracteriza por ser de herencia ligada al cromosoma X y por la deficiencia en la producción de la enzima Iduronato 2-sulfato sulfatasa encargada de catalizar la hidrólisis de los esteres terminales de los GAGs heparán y dermatán sulfato ocasionando su acumulación en los tejidos conectivo, cartilaginoso y óseo con el consiguiente trastorno progresivo de funciones y afectando las funciones cerebrales e inteligencia. Por otro lado en el Síndrome de Morquio A se presenta deficiencia de la enzima Galactosa 6-sulfatasa encargada de hidrolizar el enlace sulfato éster del N-acetilgalactosamina-6-sulfato en el extremo no reductor del condroitin-6-Sulfato y los enlaces sulfato éster de la galactosa-6-sulfato en el extremo no reductor del queratán sulfato ocasionando su acumulación en tejido óseo sin compromiso neuronal. Con el fin de contribuir en la búsqueda de soluciones terapéuticas como la TRE para tratar estas enfermedades, se realizó la búsqueda de publicaciones científicas encaminadas a profundizar en los mecanismos de glicosilación de estas enzimas en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, la cual se ha convertido en un modelo biológico de fácil acceso, manipulable y que presenta un proceso de glicosilación afín al llevado a cabo por eucariotas, teniendo en cuenta criterios como la predicción computacional de la enzimas y los adelantos en ingeniería genética.

1. INTRODUCCIÓN

Las mutaciones en los genes que codifican para las proteínas involucradas en diversas rutas metabólicas y la deficiencia de las mismas en el organismo humano, desencadenan desordenes bioquímicos conocidos como Errores Innatos del Metabolismo (EIM); estos desordenes se caracterizan por producir una variada gama de síntomas que dependen del grado de alteración o importancia metabólica de la proteína defectuosa. El Síndrome de Hunter o Mucopolisacaridosis Tipo II (MPSII), al igual que el Síndrome de Morquio Tipo A o Mucopolisacaridosis Tipo IV (MPSIVA) constituyen EIM. Ambos EIM son desordenes lisosomales que se caracterizan por la acumulación de glucosaminoglicanos (GAGs) como heparán y dermatán sulfato en el primer caso y queratán y condroitín sulfato en el segundo (12, 61).

La acumulación de GAGs constituye un cuadro clínico que abarca diferentes síntomas; los más comunes para el Síndrome de Hunter son el retardo mental, las deformidades óseas, daño en funciones cardiovasculares, pérdida de sentidos como oído y visión y por último muerte a edad temprana. Para el Síndrome de Morquio Tipo A los síntomas más comunes son protusión del esternón, cuello corto, baja estatura, hipoplasia odontoidea y cardiopatía (29, 56, 75).

Las Mucopolisacaridosis Tipo II y IV no tienen cura, sin embargo, la Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE) se ha convertido en una de las opciones viables para tratar los síntomas. La TRE proporciona al paciente cantidades de la enzima deficiente, que para el Síndrome de Hunter sería la Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa (IDS), (E.C. 3.1.6.13) y para el Síndrome de Morquio A sería la galactosa-6-Sulfatasa

(GALNS), (E.C. 3.1.6.4) de origen exógeno; en ambos casos se ha logrado disminuir la acumulación de GAGs y la sintomatología (25, 91).

Para realizar estudios clínicos de TRE es indispensable obtener cantidades clínicamente representativas de cada enzima, por lo cual se hace necesario encontrar modelos biológicos recombinantes que lo permitan. Hasta la fecha se han empleado sistemas de expresión de proteínas que incluye la expresión en células de eucariotes superiores, levaduras y bacterias (14, 23, 24, 60, 82).

Se ha demostrado que los modelos biológicos obtenidos por modificación genética son capaces de expresar las proteínas heterólogas. En el caso de las levaduras se ha utilizado *Pichia pastoris*, que es una levadura metilotrófica y se caracteriza por alcanzar niveles altos de expresión y posee varias ventajas como facilidad en la manipulación genética, comparado con líneas celulares; por otra parte a diferencia de los sistemas de expresión procarióticos, esta levadura puede llevar a cabo modificaciones postraduccionales muy similares a las que llevan a cabo eucariotas superiores (22, 40).

Con el fin de aproximarnos teóricamente a los mecanismos de glicosilación de proteínas en humanos y en *P. pastoris* y más exactamente a los mecanismos bioquímicos de los procesos de glicosilación de las enzimas IDS y GALNS y al efecto de la glicosilación de estas proteínas sobre el reconocimiento por las células blanco en los síndromes de Hunter y Morquio A se presenta este trabajo que resume evidencias del proceso bioquímico de la glicosilación relacionados con la expresión de las proteínas humanas IDS y GALNS en *P. Pastoris*, así como de la influencia de los patrones de glicosilación en la actividad biológica y en los niveles de expresión.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Justificación

El Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) en colaboración con el Departamento de Química y con el Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) de la Pontificia Universidad Javeriana, desde hace varios años lidera investigaciones encaminadas a la expresión de proteínas recombinantes con utilidad en TRE enfatizando en el diagnóstico y tratamiento de MPS como el Síndrome de Hunter y el Síndrome de Morquio A de los cuales se han estudiado ampliamente sus mecanismos moleculares y debido a la importancia que tiene el saber que actualmente en nuestro país de los veintiséis pacientes diagnosticados con Síndrome de Hunter se encuentran en tratamiento tres y treinta y siete pacientes fueron diagnosticados con Síndrome de Morquio A (59, 91).

Estos estudios permiten avanzar en el continuo hallazgo de nuevas técnicas para su confirmación bioquímica y en el desarrollo en avances biotecnológicos en la búsqueda de alternativas terapéuticas como la TRE. Con relación al abordaje por TRE de estas patologías, se ha logrado la expresión en forma activa de la IDS_{hr} en *E. coli* y *P. pastoris*. Actualmente se trabaja en el mejoramiento de los niveles de expresión a través de la optimización de los genes así como en la puesta a punto de los procesos de purificación (59, 91).

Los resultados que se obtengan sin duda contribuirán en la formulación de nuevas estrategias para la producción de IDS y GALNS para la TRE de MPS I y MPS IV A.

2.2. Planteamiento del problema

Las deficiencias enzimáticas generadas como consecuencia de las mutaciones, producen diversas clases de enfermedades, lo que las convierte en enfermedades; algunas de ellas sin tratamiento farmacológico convencional. En Colombia, en los últimos 20 años los estudios moleculares en el tema han enfatizado en el diagnóstico y tratamiento de MPS como Síndrome de Hunter y el Síndrome de Morquio A; permitiendo establecer nuevas técnicas para su confirmación bioquímica y el desarrollo en avances biotecnológicos en la búsqueda de alternativas terapéuticas como la TRE. Este tipo de terapia hace posible el suministro de las enzimas necesarias las cuales deben ser obtenidas o producidas en sistemas biológicos seguros y compatibles. *Pichia pastoris* entre otros organismos ha sido utilizada para la producción de proteínas heterólogas con utilidad terapéutica (7, 26, 81); razón por la cual ha sido seleccionada como modelo de estudio de la glicosilación y expresión de las proteínas objeto de estudio de este trabajo.

3. MARCO TEÓRICO Y REFERENTES CONCEPTUALES

3.1. Errores Innatos del Metabolismo

Las alteraciones bioquímicas que se generan por la deficiencia de algunas enzimas, son producidas por mutaciones que modifican las características fenotípicas de estas proteínas, afectando gravemente su capacidad funcional. Algunas de estas alteraciones se conocen con el nombre de Errores Innatos del metabolismo (EIM), (9). Los EIM son enfermedades poco frecuentes que por lo general no cuentan con tratamientos farmacológicos convencionales. Aunque estas enfermedades tienen una baja incidencia son muy importantes por su magnitud como problema de salud, por su gravedad y debido a que son la causa de muertes prematuras, trastornos neurológicos severos, retraso mental y en general un mala calidad de vida (71).

En el caso de personas que muestran enfermedades hereditarias relacionadas con la deficiencia de enzimas que participan en la degradación de moléculas lisosomales, se presenta una variedad de EIM conocidos como enfermedades de almacenamiento lisosomal constituyendo un grupo de aproximadamente tres docenas de desordenes humanos heterogéneos, caracterizados por la acumulación de macromoléculas no digeribles en los lisosomas. Estas enfermedades se clasifican generalmente por el sustrato acumulado; por ejemplo las Esfingolipidosis, las Glicoproteinosis, las Mucopolipodosis, las Mucopolisacaridosis, entre otras (50, 62, 71).

En la actualidad se conocen 11 tipos de MPS que pueden generar siete tipos de Síndromes y varios subtipos (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos de los desordenes lisosomales causados por deficiencias enzimáticas reportados (1, 39, 89).

<i>Tipo</i>	<i>Síndrome Nombre habitual</i>	<i>Enzima deficiente</i>
MPS IH	Hurler	α -L-Iduronidasa (E.C. 3.2.1.76)
MPS IH	Scheie	α -L-Iduronidasa (E.C. 3.2.1.76)
MPS IHS	Hurler-Scheie	α -L-Iduronidasa (E.C. 3.2.1.76)
MPS II	Hunter	Iduronato 2-sulfato sulfatasa (E.C. 3.1.6.13)
MPS IIIA	Sanfilipo A	Heparán <i>N</i> -sulfatasa (E.C. 3.10.1.1)
MPS IIIB	Sanfilipo B	α - <i>N</i> -Acetilglucosaminidasa (E.C. 3.2.1.50)
MPS IIIC	Sanfilipo C	<i>N</i> -Acetiltrasferasa (E.C.)
MPS IIID	Sanfilipo D	<i>N</i> -Acetilglucosamina-6-sulfatasa (E.C.)
MPS IVA	Morquio A	Galactosa 6-sulfatasa (E.C. 3.1.6.4)
MPS IVB	Morquio B	β -Galactosidasa (E.C. 3.2.1.23)
MPS VI	Maroteaux-Lamy	<i>N</i> -Acetilgalactosamina- 4-sulfatasa (E.C. 3.1.6.1)
MPS VII	Sly	β -Glucuronidasa (E.C. 3.2.1.31)
MPS IX	Deficiencia de Hialorunidasa	Deficiencia de Hialorunidasa (gen en estudio)

Los GAGs son un grupo de polisacáridos que pueden hacer parte del tejido conectivo o estar presentes como carbohidratos en la superficie celular, sus funciones principales incluyen la interacción celular y la respuesta a estímulos exteriores (79). A parte de la importancia funcional que cumplen los GAGs su degradación debe llevarse a cabo por enzimas lisosomales debido a que la acumulación de estas moléculas eventualmente resulta en difusiones celulares, en los tejidos y órganos (39).

Cuando estas moléculas se acumulan en los lisosomas de los diferentes tipos celulares, como en el Sistema Nervioso Central (SNC), (32), se presentan las

Mucopolisacaridosis, las que son clasificadas de acuerdo al tipo de enzimas deficientes (1, 63).

3.2. Mucopolisacaridosis Tipo II o Síndrome de Hunter

Dos de los GAGs conocidos son el heparán y el dermatán sulfato; para su degradación se requiere de la enzima Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa (E.C. 3.1.6.13), (IDS), que cataliza la hidrólisis de sus esteres terminales (37). La deficiencia de esta enzima causa la Mucopolisacaridosis tipo II conocida también como Síndrome de Hunter (OMIM 309900), una enfermedad que se caracteriza por ser de herencia ligada al cromosoma X y por la acumulación de heparán y dermatán sulfato en los tejidos conectivo, cartilaginoso y óseo fundamentalmente con el consiguiente trastorno progresivo de funciones (15). La incidencia de esta enfermedad se estima 1:132,000 hombres vivos en Gran Bretaña y 1:111,000 nacimientos en Columbia Británica y 1:72,000 en Irlanda del Norte (15, 56), en Colombia solamente existen publicaciones a partir del año 1987, ya que fue a partir de 1985 cuando estuvieron disponibles técnicas bioquímicas de diagnóstico de la enfermedad, estandarizadas en los siguientes años. En Colombia, durante los últimos 20 años se han identificado 26 pacientes con esta enfermedad de los cuales 3 están siendo tratados en la actualidad con TRE (7).

La IDS es una de las nueve sulfatasas que hidrolizan los esteres de sulfato en las células humanas, actúa en los residuos sulfatados de monosacáridos en una variedad de sustratos complejos. El mecanismo de acción en los lisosomas es el de una exosulfatasa que hidroliza el ester C₂-sulfato de los residuos terminales no reductores del ácido idurónico en el heparán y en el dermatán sulfato (106).

Al igual que todas las hidrolasas ácidas, la IDS se sintetiza en el RE rugoso, donde también inicia la N-glicosilación, posteriormente en la cara *cis* del Complejo de

Golgi adquiere un marcador de reconocimiento manosa 6-fosfato (Man-6-P), el cual es de gran importancia debido a la alta afinidad que presenta con los receptores de manosa fosfato (MPRs), necesario para ser transportada hasta los lisosomas. Finalmente el complejo MPR-IDS es transportado al compartimiento perisosomal donde el pH ácido causa la liberación de la enzima en el compartimiento lisosomal (77).

En humanos la ausencia de la IDS está ligada hereditariamente de forma recesiva al cromosoma X, debido a que el gen de 24kb que codifica esta enzima se encuentra en el locus Xq28 (53). Este gen de 9 exones y 8 intrones codifica para una proteína de 550 AA (28), el cual se sintetiza como un precursor de 76kDa que recibe la modificación de los residuos N-glucosidos y la adición del grupo 6-fosfato en las manosas terminales y tras ser transportado a los compartimientos lisosomales sufre procesamiento proteolítico para madurar en una forma de 45kDa ya que existe eliminación de una forma menor de 14-18 KDa. Estas formas maduras son el resultado, de un procesamiento que incluye glicosilaciones, deglicosilaciones, fosforilaciones y proteólisis (72).

Aunque se han identificado más de 300 mutaciones diferentes en el locus IDS, la mayoría de las alteraciones se deben a sustitución de nucleótidos, errores en la maduración del RNA ("splicing"), inserciones o deleciones puntuales, deleciones parciales del gen o rearrreglos del gen completo (103).

3.3. Manifestaciones Clínicas del Síndrome de Hunter

La acumulación de GAGs como consecuencia de la deficiencia enzimática de IDS ocurre en algunos de los siguientes tipos celulares: osteocitos, ictiocitos, células endoteliales, células musculares lisas de la intima vascular, en los fibroblastos y algunas células fagocitarias mononucleares. La alteración de estas células puede

conducir a un efecto multisistémico que incluye manifestaciones clínicas con implicaciones somáticas y neurológicas progresivas que varían desde casos leves hasta algunos severos (32).

El proceso de acumulación del sustrato en los lisosomas comienza en el período fetal, pero generalmente las manifestaciones clínicas de la enfermedad se presenta entre los dos y cuatro años de edad (71) y se caracterizan por presentar macrocefalia, estatura baja, rasgos faciales toscos (engrosamiento de las fosas nasales, labios y lengua y dimorfismo facial), macroglosia, cuello corto, vías aéreas blandas (laringotraqueobroncomalacia), dilatación ventricular cerebral, deformidades óseas (mano en garra, disostosis múltiple), organomegalia (hepato y esplenomegalia), hernia umbilical, retardo psicomotor pronunciado y varios grados de retardo mental (Figura 1), (56, 71).

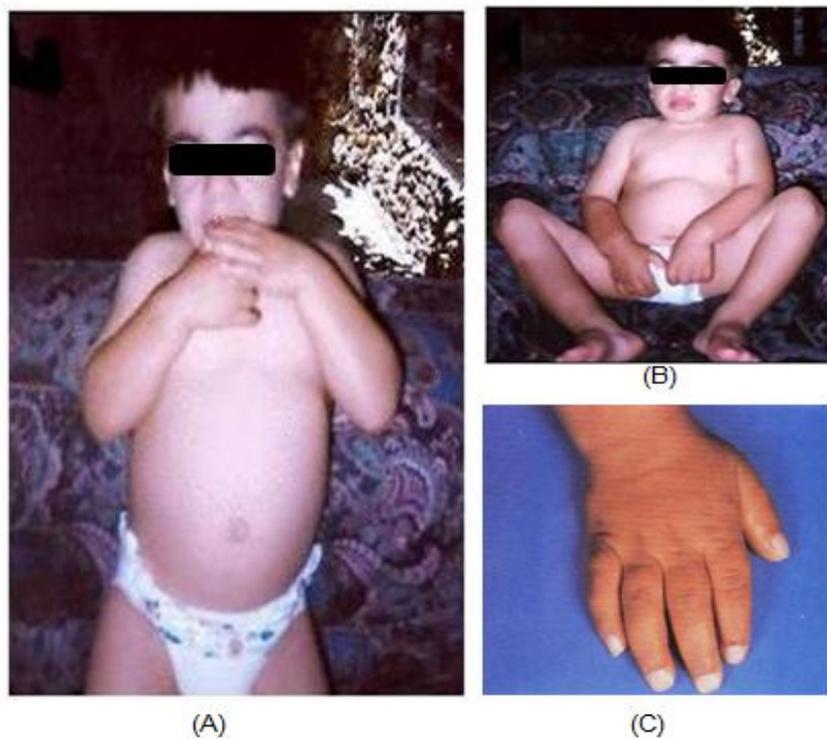


Figura 1. Síntomas asociados a Síndrome de Hunter: Hepatomegalia (A), facies toscas (B), mano de garra (C), (Paciente Hunter, diagnosticado en el IEIM, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C. Colombia).

Los pacientes pueden presentar obstrucción de las vías aéreas, asociada con el síndrome y atribuida a las implicaciones del SNC o anomalías mecánicas causadas por la acumulación de GAGs en los tejidos blandos de la cabeza y el cuello (109). Otras manifestaciones son fallas en el movimiento articular, daño en las funciones cardiovasculares, excreción urinaria aumentada de dermatán y el heparán sulfato, anomalías cardíacas, hipertrofia adenotonsilar, pérdida de la visión por degeneración retinal severa y pérdida del oído (39, 109).

Las enfermedades cardíacas son comunes en las personas con ese síndrome, afectando al 91% de los casos. Se han descrito diferentes anomalías incluyendo trastornos cardiovasculares como alteraciones en las válvulas mitral y aórtica, engrosamiento del miocardio, regurgitación mitral, estrechamiento de la arteria coronaria, estenosis de la válvula mitral, arritmias, insuficiencia aórtica, infarto de miocardio, muerte súbita, hipertensión pulmonar y falla cardíaca congestiva (31, 56).

En la forma severa de la enfermedad (MPSII A) la muerte ocurre entre los 5 y 6 años, las causas principales son fallas cardíacas y neumonía (109). En los casos en los que la manifestación es leve (MPSII B) no involucra el SNC, los compromisos esqueléticos y morfométricos comienzan a generar problemas hacia la segunda o tercera década de vida y esta a la vez suele ser más prologada que en los pacientes con manifestación severa (56), incluso algunos individuos con la forma leve logran mantener su intelecto normal y alcanzar la cuarta década de vida (109).

3.4. *Iduronato 2-Sulfato-Sulfatasa Humana (IDS)*

La Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa (EC 3.1.6.13) es una hidrolasa, la cual actúa sobre enlaces éster-sulfato y cataliza la reacción de hidrólisis del grupo sulfato en posición C₂ del ácido L-idurónico presente en el dermatán sulfato y heparán

sulfato (91). Un péptido precursor de 550 aminoácidos es codificado por cDNA de 2.3 Kb (15). Este precursor presenta 8 sitios potenciales de glicosilación, 62 de O-glicosilación y 26 de fosforilación (91). Los primeros 25 residuos corresponden a la secuencia del péptido señal y otros 8 residuos son removidos posteriormente, durante el proceso de maduración de la proteína (91). La comparación de la secuencia de aminoácidos de la IDS_h muestra homología con otras sulfatasas estudiadas, como la Arilsulfatasa A (E.C. 3.1.6.8), la B (E.C. 3.1.6.12) y la C (E.C. 3.1.6.2). Mediante mutagénesis dirigida en células COS se comprobó, que en el centro activo está relacionado con la cisteína en posición 84 (73), que al igual que en otras sulfatasas para su actividad catalítica requiere la conversión postranslacional a ácido 2-amino-3-oxopropico o formil-glicina (Figura 2), (34).

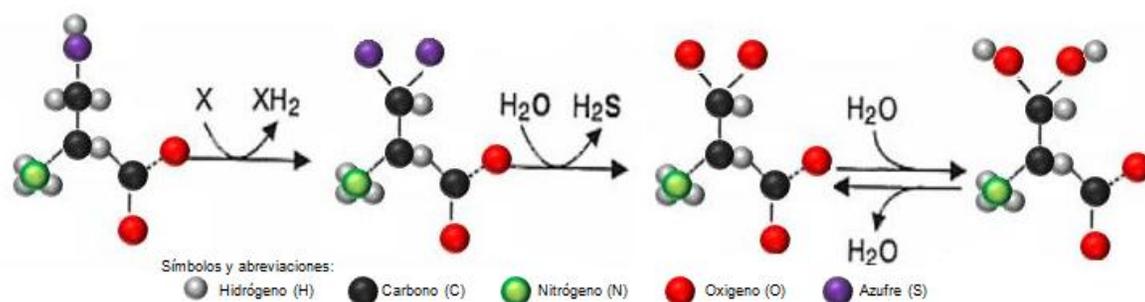


Figura 2. Mecanismo de conversión de cisteína a formil-glicina. El grupo tiol es oxidado hasta tialdehído, usando un compuesto X como agente aceptor de hidrógenos. Seguido, el tialdehído es hidrolizado y se libera H₂S, finalmente el aldehído se regenera por la hidratación. Modificado de (104).

La IDS ha sido aislada de fluidos corporales como líquido amniótico, plasma y orina (59), de órganos como placenta, hígado, riñón e intestino (32), de fibroblastos humanos (72); por otro lado la enzima recombinante ha sido obtenida a partir del cultivo de células de organismos superiores (73). En todos los casos se ha considerado que las formas maduras presentan pesos moleculares que oscilan

entre 42 y 45 kDa y que existe eliminación de una forma menor de 14-18 kDa (73). Estas formas maduras son el producto, de un procesamiento que incluye glicosilaciones, deglicosilaciones, fosforilaciones y proteólisis (73). Inicialmente un precursor de 76 kDa, es sintetizado y por mecanismos de fosforilación y glicosilación se genera una forma de 90 kDa, la cual, por proteólisis origina una forma de 62 kDa y otra de 18 kDa. Posteriormente una deglicosilación conduce a la formación de un glicopéptido de 55kDa que finalmente por una segunda proteólisis resulta en la forma madura de la IDS (45 kDa), (73), (Figura 3).

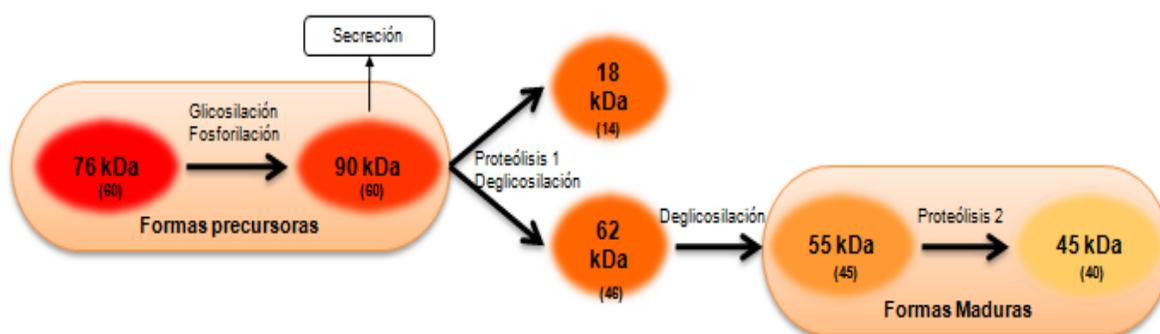


Figura 3. Procesamiento de la IDS. Pasos de glicosilación, fosforilación, deglicosilación y procesamiento proteolítico llevado a cabo por las células de mamíferos. Los números dentro de los paréntesis indican los pesos moleculares (kDa) de polipéptidos sin glicosilaciones. Modificado de (72).

Se han caracterizado varias isoformas de la IDS en tejidos y fluidos humanos y se han encontrado tres, la A, la B y la C. En hígado, las formas A y B sólo se distinguen entre ellas por su punto isoeléctrico, siendo la forma B la más ácida (estas se hacen idénticas al eliminarle el ácido siálico). Tanto en suero como en líquido amniótico se ha encontrado únicamente la forma C, mientras que en orina y en el cultivo de fibroblastos sólo se han encontrado las formas A y B. La forma A resultó ser más termolábil que la forma B (25), mientras que la actividad enzimática óptima a pH de 4,5 (83), decrece después de 55°C y es nula por encima

de 64°C. Los procesos de purificación han resultado poco eficientes, así, cuando se utilizó la precipitación con sulfato de amonio, columnas cromatográficas con A-sefarosa y DEAE Bio-Gel, se extrajeron las formas A y B con rendimientos de 2,3% y 21,2% y grados de pureza del orden de 6,7 y 37,6 % respectivamente. También se tiene registros de purificación de la IDS a partir de hígado y otros órganos como placenta, riñón e intestino, en los que se ha obtenido resultados similares con recuperaciones de 2% y 5% y grados de pureza para las formas A y B del hígado. En todos los casos estudiados, se obtuvieron formas peptídicas largas y cortas de IDS purificada, tanto para las formas A como para las formas B, encontrándose variación de peso molecular entre 39 y 44 kDa y entre 17 y 18,5 kDa al establecerse los pesos por exclusión molecular, mientras que por electroforesis fueron de 42 kDa y de 30 kDa para el péptido largo y para el corto de 18 kDa y de 14 kDa (59).

3.5. Mucopolisacaridosis Tipo IVA o Síndrome de Morquio A

La Mucopolisacaridosis IVA (OMIM 253000) es un EIM de depósito lisosómico, causado por la deficiencia de la enzima N-acetil-galactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS), (E.C.3.1.6.4), involucrada en la degradación de queratán sulfato y condroitín-6-sulfato, con la consecuente acumulación intralisosómica de estos GAGs y el aumento de los mismos en la excreción urinaria, lo que ocasiona displasia ósea, la enzima generalmente es capaz de hidrolizar los enlaces éster de los GAGs queratán sulfato, condroitin-6-sulfato y galactosa-6-sulfato (44).

El síndrome de Morquio A es considerado una enfermedad de herencia autosómica recesiva, con una frecuencia estimada entre 1 por cada 75.000 a 1 en 200.000 nacimientos (54). En Colombia se ha identificado esta patología en las representaciones antropomorfas de la cultura precolombina de Tumaco-La Tolita y se han estudiado sus bases genéticas en grupos de poblaciones del altiplano cundiboyacense (96). La enfermedad de Morquio A es la mucopolisacaridosis con

mayor número de casos reportados en el país (96). De hecho, Colombia podría ser el segundo país, después de Brasil, con el mayor número de pacientes afectados por esta enfermedad en Latinoamérica (7, 44). A pesar de que la TRE para la enfermedad de Morquio A, comenzó sus ensayos clínicos en el 2008 es necesario continuar evaluando otras alternativas que permitan mantener niveles terapéuticos de la enzima por un período prolongado y con lo cual se logre corregir el defecto en la mayoría de tejidos posibles (44, 74, 98).

La Mucopolisacaridosis tipo IV fue descrita en Uruguay por Morquio en 1929, en 4 hermanos afectados, descendientes de padres suecos (97). La excreción de queratán sulfato en la orina es la característica definitiva que orienta el diagnóstico; la degradación defectuosa de este GAGs lleva a la acumulación en tejidos donde normalmente es abundante: cartílago y núcleo pulposo de la córnea (98).

El defecto bioquímico de la Mucopolisacaridosis IVA se encuentra en la actividad deficiente de la de N-acetil-galactosamina-6-sulfatasa, encargada de la remoción de los componentes de galactosa-6-sulfato del queratán sulfato. Esta enzima también cataliza la eliminación del sulfato de los residuos de N-acetilgalactosamina-6-sulfato, presentes en el condroitín sulfato, lo que lleva al aumento de la excreción urinaria. Durante la degradación del queratán sulfato, la galactosa terminal es escindida por la β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.22), enzima defectuosa en el síndrome de Morquio tipo B (96).

3.6. Manifestaciones Clínicas del Síndrome de Morquio A

El cuadro clínico de las Mucopolisacaridosis tipo IVA y IVB es indistinguible, y ambas tienen una heterogeneidad clínica amplia. Las principales características del síndrome son las anormalidades esqueléticas: baja talla, particularmente de tronco corto, tórax en tonel y *pectus carinatum*, *genu valgo*, hiperlaxitud articular y

opacidades corneales. El crecimiento está muy comprometido desde antes de los 5 años de edad y la estatura promedio se encuentra entre los 85 y los 100 cm, pero no se presenta retardo mental como en las demás mucopolisacaridosis (**Figura 4**), (2, 4).

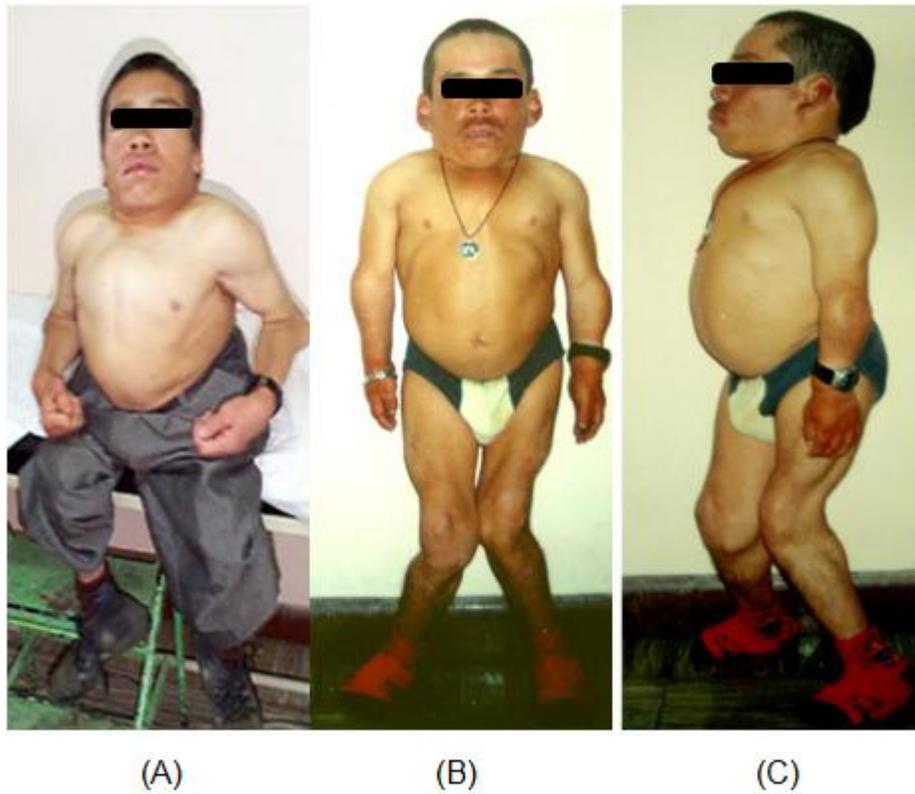


Figura 4. Síntomas asociados a Síndrome de Morquio A: esternón prominente (A), torax en tonel (A), genu *valgo* (B), tronco corto (C), (Paciente Morquio A, diagnosticado en el IEIM, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C. Colombia).

La mayoría de los pacientes presenta opacidad corneal fina, visible con la lámpara de hendidura, pero puede convertirse en una opacidad sintomática (51). La sordera neurosensorial usualmente se inicia en la segunda década de la vida y afecta al 100% de los pacientes después de los 20 años (55). Una manifestación constante

pero tardía es la regurgitación aórtica, la cual asociada a la escoliosis genera problemas respiratorios, constituyendo las causas principales de mortalidad de los afectados (8).

Los hallazgos radiológicos varían con la edad del paciente; la MPS IVA es la única Mucopolisacaridosis que no presenta cambios óseos similares a la disostosis múltiple. Los cambios más representativos son la platiespondilia, la hipoplasia odontoidea, la *coxa valga* y el aplanamiento progresivo de la cabeza femoral; los metacarpos son cortos y anchos (84). Una complicación peligrosa, secundaria a la deformidad ósea, es la compresión medular, seguida de subluxación atlantoaxoidea; los signos neurológicos de compresión pueden incluir debilidad, dificultad en la marcha, paraplejía, pérdida de la sensación vibratoria de las extremidades e hiperreflexia (96).

3.7. *N*-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS)

El gen para la *N*-acetil-galactosamina-6-sulfato sulfatasa se encuentra en el locus 16q24.3 y el gen de la β -galactosidasa está localizado en el locus 3p21 (78). El gen de la *N*-acetil-galactosamina-6-sulfatasa contiene 14 exones que abarcan 50Kb y se transcribe en un cDNA de 1566 bp que codifica los 522 residuos de glicopéptidos de aproximadamente 60kDa, la cual es procesada a 40 kDa y 15 kDa; estos monómeros se encuentran unidos por un puente disulfuro (61). Hasta la fecha se han identificado más de 100 mutaciones de la enzima GALNS, incluyendo 78 mutaciones sin sentido y con cambio de sentido, 9 mutaciones en el sitio del empalme, 15 deleciones cortas y 2 largas, 2 inserciones pequeñas y 2 reorganizaciones del complejo. La heterogenicidad alélica está presuntamente correlacionada con el fenotipo clínico (78).

La modificación postraduccional más importante de GALNS, al igual que otras sulfatasas, es la activación del sitio activo de la enzima formilglicina generada (27). En mamíferos la FGE es una enzima del RE que cataliza la formación de residuos de formilglicina (FGly) a partir de una cisteína necesaria para extraer el sulfato de los GAGs (27) y de esta manera las mutaciones en el dominio del sitio catalítico del GALNS conducen a una actividad nula y formas graves de la enfermedad. Sin embargo, FGE es una enzima altamente conservada en procariotes y en eucariotes, con la excepción de levaduras, en las que existe una enzima homóloga que aun no ha sido identificada (88).

La enzima GALNS hidroliza el enlace sulfato éster del N-acetilgalactosamina-6-sulfato en el extremo no reductor del condroitin-6-Sulfato y los enlaces sulfato éster de la galactosa-6-sulfato en el extremo no reductor del queratán sulfato (74, 78). Al igual que otras sulfatasas lisosomales, GALNS se caracteriza por tener 2 modificaciones postraduccionales importantes: 1) La conversión de Cisteína a Formilglicina (FGly) en el sitio activo de la enzima y 2) las N-glicosilaciones llevadas a cabo en el interior del RE y en el aparato de Golgi (88).

En la primera modificación se encuentra que hasta el momento las sulfatasas estudiadas cuentan con una FGly residual en el sitio catalítico, que es esencial para la actividad enzimática. La formación de los residuos de FGly ocurre por la oxidación de una cisteína altamente conservada, que se encuentra ubicada en la posición 79 de la secuencia de GALNS por acción de la FGE. La FGE es codificada por la sulfatasa modificando el factor 1, el cual ha sido conservado evolutivamente y constituye a al mismo tiempo una nueva familia de proteínas conservadas en procariotes y eucariotes (88).

Respecto a la segunda modificación, se sabe que es común para las enzimas lisosomales, ya que la N-glicosilación adiciona de 2-3 kDa por cadena de carbohidratos al peso total de la enzima. GALNS cuenta con 2 sitios potenciales para llevar a cabo N-glicosilación, teniendo en cuenta que cerca de 4-6 kDa del peso total de la enzima corresponde a la cadena de carbohidratos. En mamíferos la N-glicosilación trabaja como una señal de reconocimiento para el receptor manosa y manosa6-fosfato (M6P) que facilita la llegada de la enzima a los lisosomas y regula su funcionamiento celular. De esta forma, la ausencia de las N-glicosilaciones puede afectar la actividad, el plegamiento, la estabilidad y la oligomerización de la enzima (88).

En el Síndrome de Morquio A, las mutaciones en el sitio de N-glicosilación de la GALNS, ocasionan una reducción de la actividad enzimática que genera fenotipos atenuados, pérdida de actividad enzimática y la degradación final (74). Sin embargo, algunos reportes sugieren que la N-glicosilación no está vista como un requerimiento para la actividad enzimática de GALNS, ya que existe un efecto variable en su actividad, en el plegamiento, en la estabilidad y en la oligomerización (88).

3.8. Generalidades de las glicoproteínas

Las glicoproteínas son proteínas con uno o más grupos de carbohidratos (glicanos), unidos por enlaces covalentes a ciertos aminoácidos de la cadena polipeptídica. Un alto porcentaje (91,7%) de las proteínas de mamíferos son glicoproteínas, el 8,3% restante son proteínas no glicosiladas, algunas de las cuales se asocian a subunidades glicosiladas (21). Las glicoproteínas están presentes en todos los organismos vivos con diversidad de funciones. Son glicoproteínas los receptores, componentes de canales y transportadores de membranas biológicas, hormonas, enzimas, factores de transcripción, represores de genes, componentes de la matriz

extracelular, moléculas de adherencia, inmunoglobulinas y moléculas estructurales. Esto explica la diversidad de funciones en las cuales están involucradas estas biomoléculas, entre las cuales se puede señalar el reconocimiento celular, el intercambio molecular entre las células y el intercambio molecular entre las células y el medio, la transmisión de mensajes bajo el control de los sistemas nervioso y hormonal, la actividad de células contráctiles, el bloqueo e inducción de rutas metabólicas, el equilibrio iónico y el equilibrio molecular intra y extracelular, algunas actividades relacionadas con la respuesta inmune, la regulación del ciclo celular, el reconocimiento de las células blanco entre otras (38).

Alteraciones en varios puntos de las rutas metabólicas de síntesis y degradación de glicoproteínas han sido identificadas como responsables de disfunciones asociadas a algunas enfermedades (69). Generalmente los defectos a nivel de glicoproteínas son producto de alteración de los genes que codifican para estas, que produce enfermedades sin tratamiento farmacológico convencional. Sin embargo, los avances biotecnológicos de los últimos años han permitido la realización de estudios tendientes a la búsqueda de alternativas terapéuticas, entre ellos la TRE, (69).

3.9. Clase de glicoproteínas

Basados en la unión entre la secuencia aminoacídica y las cadenas hidrocarbonadas, las glicoproteínas, pueden clasificarse en tres grupos (47):

- a) N-glicosiladas, en cuyo caso se presentan enlaces glucosídicos tipo N, es decir, uniones que involucran el grupo amida de la asparagina (Asn) y el azúcar N-acetilglucosamina, en las secuencias Asn - X - Ser y Asn -X - Tre, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina.

- b) O-glicosiladas, en las cuales existe un enlaces glucosidicos tipo O, es decir uniones entre el OH de serina o treonina y el azúcar N-acetilgalactosamina, se incluyen aquí las uniones a la hidroxiprolina e hidroxilisina de los colágenos.
- c) GPI-enlazadas, en las cuales se encuentran enlaces glucosilfosfatidilinositol (GPI), es decir, la unión entre el aminoácido terminal del extremo carboxilo y un residuo fosforiletanolamida unido a un oligosacárido, el cual al mismo tiempo está unido mediante una glucosamina al fosfotidilinositol.

Tanto el número de cadenas de oligosacáridos (desde 1 hasta 30 cadenas), como la composición de azúcares es variable, lo cual explica la gran diversidad de glicoproteínas que se puede encontrar en los organismos vivos (47).

3.10. Proceso de glicosilación de proteínas

La glicosilación de proteínas ocurre por una vía biológica compleja y ordenada, dependiendo de la secuencia de la proteína, del fenotipo celular y del medio ambiente fisiológico de la célula sintetizadora. Este proceso puede ser descrito como un conjunto de eventos químicos que se inician en el Retículo Endoplasmático (RE) y terminan en el Aparato de Golgi (47).

Los mecanismos de N-glicosilación y de glicosilación enlazada a GPI son muy conservados evolutivamente, a diferencia de lo que ocurre con las O-glicoproteínas (47).

Los mecanismos de glicosilación proteica en humanos son:

N-Glicosilación: La síntesis de la secuencia aminoacídica de toda proteína N-glicosilada se inicia en ribosomas libres en el citoplasma, con la traducción de su

correspondiente ARNm. En principio se sintetiza una secuencia de 25-30 aminoácidos hidrofóbicos que van a constituir la secuencia señal (67). Al empezar a emerger estos aminoácidos del canal del ribosoma son reconocidos por la partícula de reconocimiento de la secuencia señal (PRS), ribonucleoproteína compuesta por 300 ribonucleótidos y seis péptidos (67). La síntesis proteica se detiene hasta que el complejo ribosoma-péptido señal-PRS encuentra sobre la membrana del retículo un complejo de proteínas, conocido como translocón (67) el cual está compuesto por el receptor de la PRS, el receptor del ribosoma, el receptor de la secuencia señal, la peptidasa señal (E.C. 3.4.21.89), la oligosacaril transferasa (E.C. 2.4.1.119) y la secuencia 69 que constituye el canal por el cual se transloca el péptido naciente hacia el lumen del retículo endoplasmático (RE), compartimento donde sufrirá modificaciones postraduccionales como la eliminación del péptido señal por la peptidasa señal, la formación y reorganización de puentes de disulfuro por la proteína disulfuro isomerasa (E.C. 5.3.4.1), la adición y eliminación de azúcares y el plegamiento (17, 45, 47, 69).

La síntesis del oligosacárido a ser transferido a un residuo de asparagina del péptido naciente, se inicia en la cara citoplasmática de la membrana del retículo. Un lípido de membrana, el dolicol-fosfato que está compuesto por unas veinte unidades de isopreno, sirve como aceptor e inicialmente le es transferida una molécula de N-acetilglucosamina-P (GlcNAc-P) a partir de UDP-GlcNAc bajo la catálisis de la GlcNAc-fosfotransferasa (E.C. 2.7.8.17). Posteriormente otra GlcNAc-transferasa cataliza la adición de una nueva molécula de GlcNAc, luego secuencialmente a partir de nucleótidos GDP-manosa le son agregados cinco manosas con el concurso de las manosil transferasas I, II, III, IV y V. El complejo formado es trasladado a través de la membrana del retículo Endoplasmático (RE), producto de un movimiento de tipo "flip flop" dirigido por una flipasa (E.C. 3.6.3.1) e hidrólisis de ATP. Las manosil transferasas VI (E.C. 2.4.1.130), VII, VIII y

IX, (residentes del RE), adicionan secuencialmente cuatro manosas y las glucosil transferasas I (E.C. 2.4.1.58) y II (E.C. 2.4.1.73) agregan una y dos moléculas de glucosa. Sin embargo, en este caso no se emplean azúcares de nucleótidos sino que el donador es el dolicol-fosfato, al cual se le transfieren los azúcares a nivel citoplasmático. El oligosacárido de 14 azúcares (2 GlcNAc-9 manosas y 3 glucosas), es transferido en bloque sobre el péptido naciente, en una reacción catalizada por la oligosacaril transferasa (E.C. 2.4.1.119). El oligosacárido sufre modificaciones en el retículo endoplasmico (RE) y luego en el complejo de Golgi. Una manosidasa (E.C. 3.2.1.113) elimina una manosa y las glucosidasas I (E.C. 3.2.1.106) y II (E.C. 3.2.1.84) hidrolizan una y las dos moléculas restantes de glucosa (46). Con excepción de *S. pombe*, que no elimina la manosa, este procesamiento oligosacaridico es conservado evolutivamente (99).

La eliminación de las tres glucosas es la base de un mecanismo de regulación de la glicoproteína, en el cual intervienen dos proteínas residentes del retículo, la calnexina y la calnereticula, la primera es un componente de membrana y la segunda es una proteína soluble (36). Luego de que dos de las glucosas han sido eliminadas, el glicopéptido se une a la calnexina y/o reticulina, y se expone al ERp57 (factor de plegamiento) y cuando el tercer residuo de glucosa es eliminado, el complejo se disocia. Si la proteína no está bien plegada, el oligosacárido es reglucosilado por una glucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.73) y la proteína se asocia con las mencionadas lectinas, repitiéndose el ciclo hasta lograr el plegamiento correcto o ser degradada por el proteosoma 23S, para lo cual es transportada retrógradamente a través de la membrana (36, 79). Al superar este punto de control la glicoproteína en formación pasa al complejo de Golgi donde continuara su procesamiento.

En el complejo de Golgi existen compartimentalizadas glucosiltransferasas, glicosidasas, fosforilasas y fosfatasas que van a permitir la modificación del

oligosacárido en formas muy variadas dependiendo del destino final, el tipo de tejido y el organismo específico. Si las proteínas son de secreción o forman parte de una membrana biológica, en la cara cis de Golgi, las manosidasas 1a y 1b (E.C. 3.2.1.113) eliminan cuatro moléculas de manosa, en la cara media, las GlcNAc transferasas I (E.C. 2.4.1.101) y II (E.C. 2.4.1.143) adicionan una y luego otra molécula de GlcNAc, mientras que la fucosil transferasa (E.C. 2.4.1.68) cataliza la reacción de transferencia de una fucosa. Finalmente, en la cara trans de Golgi la galactosil transferasa (E.C. 2.4.1.74) y la sialil transferasa (E.C. 2.4.99.10) dirigen la adición de dos galactosas y dos ácidos sialicos, respectivamente, teniendo como donadores los nucleótidos GDP-fucosa, UDP-Galactosa CMP-ácido siálico, respectivamente. Estas moléculas ingresan a las cavidades del complejo de Golgi mediante sistemas de transporte tipo antiporte, que permite la salida del nucleótido monofosfatado y con ello la reutilización de los mismos (67).

Existen tres clases de oligosacáridos unidos a proteínas por enlaces N: complejos, híbridos y de alto contenido de manosa (76). La composición de los oligosacáridos complejos, generalmente corresponde a la descrita anteriormente, sin embargo, pueden hallarse desde 2 hasta cinco cadenas hidrocarbonadas. Aunque las cadenas híbridas y de alto contenido de manosa se forman por procesamiento de cadenas complejas, todos los N-oligosacáridos conservan en común una estructura pentasacárida (2 N-acetilglucosaminas y 3 manosas), (76).

A diferencia de las glucoproteínas de secreción y de membrana, las destinadas a convertirse en proteínas lisosómicas sufren a nivel del complejo de Golgi un procesamiento diferente para ser dirigidas a los lisosomas a través de un marcador biológico específico denominado el receptor manosa 6-fosfato (30). En la cara cis de Golgi, en una primera reacción catalizada por la N-acetilglucosaminil-

vesículas al cis-Golgi. La proteína se omite a continuación. 9. α -manosidasa I. 10. NAcGlcT I. 11. α -manosidasa II. 12. FucosilT y NAcGlcTIII.. 13. NAcGlcT IV o V agregan NAcGlc para glicanos tri- o tetra-antenarios. 14. β 1-4 galT. 15. SialilT. 16. NAcGlcT y galT producen lactosaminas. 17. Exoglicosidasas (hexosaminidasas y manosidasas) pueden producir glicanos truncos paucimanosa. Tomado de (108).

O-Glicosilación: Aunque los mecanismos de O-glicosilación de proteínas no están completamente dilucidados, existen varias diferencias en la síntesis con respecto a las N-glicoproteínas. En el caso de las O-glicosilaciones la unión se realiza entre el OH de la serina/treonina y la N-acetilgalactosamina o la galactosa, en el caso de los colágenos, menos frecuentes son las O-glicosilaciones utilizando fucosa, xilosa o glucosa (50). Adicionalmente, se ha reportado las O-glicosilaciones Glucosa-tirosina y manosa-triptofano, en la glicogenia y una ARNasa humana (50). En este tipo de glicosilación, los azúcares se unen uno a uno, no participa el dolicol fosfato ni las glucosidasas (47, 77). Existen enzimas específicas para las O-glicosilaciones; sin embargo, hay otras enzimas comunes para N y O-glicosilaciones. Aunque existen unos pocos casos de O-glicosilación directa de proteínas citoplasmáticas y nucleares (99), la formación de O-glicanos se efectúa en el retículo endoplasmático (RE) y en el complejo de Golgi.

En el caso de las levaduras se inicia con la adición de dos manosas a partir del dolicol-P-Manosa y en el aparato de Golgi hay elongación con 1-7 residuos (99) mientras que para los mamíferos se han postulado dos modelos: en el primer caso, en el retículo hay adición de manosas con catálisis de la O-manosil transferasa 1 (POMT1), (E.C. 2.4.1.109) y elongación con diversos azúcares en el aparato de Golgi (50). En el segundo caso se inicia directamente en el complejo de Golgi, donde se transfieren Gal,GlcNAc, GalNAc y ocurre la elongación posterior y la

modificación por adición de polilactosamina, ácido sialico, fucosa, sulfatos y acetilos (76).

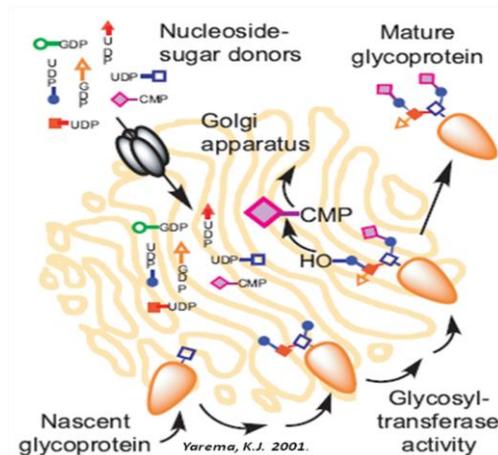


Figura 6. Proceso de O-glicosilación de proteínas en células eucariotas. Tomado de (108).

Enlazadas a GPI: es un mecanismo altamente conservado en organismos eucariotas. La primera etapa en la síntesis consiste en la transferencia de la GlcNAc, desde UDP-GlcNAc hasta el inositol fosfato (PI). El carboxi terminal de la secuencia del glucosilfosfatidilinositol (GPI) está compuesto por un péptido corto hidrofílico seguido por un péptido hidrofóbico, pero que carece de una secuencia de consenso definida. Esta secuencia es clivada en el RE y las proteínas procesadas son modificadas covalentemente junto con la forma madura del GPI. La biosíntesis se lleva a cabo en el citosol del RE por la adición de la GlcNAc al fosfatodilinositol, seguido por la N-acetilación de la glucosamina generada (GlcN)-PI, la cual migra al lumen del RE donde se convierte en la forma madura del GPI, la EtNPMan₂-(EtNP-)Man-GlcN-(acyl-)PI (EtNP = fosforil etanolamida), compuesta de tres manosas obtenidas del Dolicol-P- Manosa en el lumen del RE (68). La adición de estas tres manosas es catalizada por diferentes glicosiltransferasas denominadas: complejo PIG-M-PIG-X, PIG-V y PIG-B para la primera, segunda y tercera manosa respectivamente. Finalmente, la fracción

fosforil etanolamida permite la unión al aminoácido terminal del extremo C-t (carboxilo terminal) del péptido (47).

3.11. Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE)

Como hasta el momento solo se cuenta con tratamiento para la enfermedad de Hunter y no para la de Morquio A, los pacientes son sometidos a la terapia de sostén, enfocada a solucionar o atenuar las complicaciones respiratorias y cardiovasculares, hidrocefalia y pérdida de oído. Además, de las correcciones quirúrgicas para las hernias, disfunciones articulares, tratamiento del síndrome del túnel carpiano, mielopatías e hidrocefalia, con el objetivo de mejorar la calidad de vida del paciente (13, 43).

Recientemente se han propuesto diferentes tratamientos opcionales para esta enfermedad, uno de estos es el trasplante alogénico de médula ósea. Las pruebas realizadas para este tratamiento han demostrado corrección metabólica sistémica en algunos tejidos, desafortunadamente su aplicación es limitada debido a la escasez de donadores histocompatibles, la alta tasa de mortalidad (20-50%) y algunas complicaciones como reacciones secundarias adversas al trasplante (15). Es importante tener en cuenta que el tratamiento más adecuado para este tipo de patologías debe ser aquel que pueda implementarse en etapas tempranas de la vida y de esta manera pueda prevenir la aparición de la sintomatología y las secuelas a largo plazo (91).

Otra de las alternativas que hasta el momento es evaluada en diferentes ensayos es la Terapia Génica (TG), con la cual se trata de modificar las células involucradas en la patología por medio de la transferencia de una copia "correcta" del gen afectado "*in vivo*" o "*in vitro*", de esta forma las células modificadas pueden liberar el producto enzimático necesario corrigiendo a las células vecinas a través del

proceso de endocitosis mediada por receptor; algunas aproximaciones sobre esta corrección genética han demostrado que puede ser eficaz, estable y segura (19, 91). Los estudios realizados para optimizar esta terapia se basan en ensayos llevados a cabo en co-cultivos y fibroblastos normales o líneas celulares que expresan IDS recombinante como COS o linfoblastoides (73) y linfocitos o macrófagos transfectados con vectores retrovirales (15). Los vectores que han mostrado mayor eficiencia en la transferencia del gen son los retrovirus, como es el caso de la síntesis de IDS en linfocitos de sangre periférica (48).

Otra alternativa que ha revertido complicaciones viscerales de la acumulación lisosomal en enfermedades severas como el Síndrome de Hunter y Morquio A, es la TRE, para la cual es necesaria la clonación del gen con el fin de expresarlo en sistemas recombinantes (18, 33).

La TRE consiste en proporcionarle al paciente la enzima purificada de origen exógeno, para proveerla a los tejidos en los cuales está ausente. Hasta el momento con esta terapia se han tratado algunas enfermedades no lisosomales como la deficiencia de α 1-antitripsina, la inmunodeficiencia severa combinada, las hemofilias A y B, la deficiencia de la hormona del crecimiento y la fibrosis quística (14, 33).

Además, la TRE es una realidad para el tratamiento de MPS II, pues ya se han adelantado estudios para enfermedades lisosomales como Gaucher, Fabry, Hurler o Pompe (91). Sin embargo, se requieren cantidades suficientes de la enzima, no antigénica, con alta actividad específica y con capacidad de dirigirse a las células y compartimientos subcelulares del paciente, con el fin de hacer posible contrarrestar los efectos sistémicos que genera la acumulación de GAGs, y con la posibilidad de

comenzar el tratamiento en edades tempranas del paciente para poder prevenir la aparición de los síntomas (91).

La TRE para la enfermedades lisosomales se fundamenta en el reconocimiento y la endocitosis de las enzimas lisosomales por el receptor Man-6-P y posiblemente, también por contacto celular directo; sin embargo, no se ha logrado superar el obstáculo que representa cruzar la barrera hematoencefálica cuando los agentes terapéuticos deben ser enviados al SNC, debido a que en la mayoría de los casos las enzimas administradas de forma intravenosa son ineficientes y las consecuencias sobre la salud mental no pueden ser controladas (32).

Los receptores específicos para Man-6-P también están presentes sobre la membrana celular y son capaces de fijar las enzimas extracelulares circundantes para enviarlas a los lisosomas. Por esta razón la TRE se considera como uno de los tratamientos más viables para la MPS II en la reversión de los efectos observados en la mayoría de los tejidos afectados. Sin embargo, aunque se ha reportado que las neuronas y células gliales contienen receptores Man-6-P con los cuales pueden tomar enzimas lisosomales desde el medio extracelular y endocitarlas, es necesario que la enzima supere la barrera hematoencefálica (32, 62) y para ello deben adelantarse estudios concernientes a la búsqueda de mecanismos que permitan una internalización eficiente de la enzima (91).

La enzima requerida para esta terapia puede obtenerse de tejidos y/o fluidos corporales humanos o puede ser sintetizada en modelos biológicos recombinantes como bacterias, levaduras o líneas celulares de mamíferos, pero se requiere producir y purificar cantidades suficientes para efectuar estudios de caracterización bioquímica, bioactividad, termoestabilidad, antigenicidad y si es el caso modificarlas químicamente, antes de ser ensayadas en modelos animales (91)

y posteriormente con el fin de recuperar cantidades clínicamente útiles con las cuales se pueda implementar protocolos de TRE para la enfermedad (83).

Una de las características de la enzima IDS es la presencia de ocho sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-X-Ser-Thr) en las posiciones 31, 115, 144, 246, 280, 325, 513 y 537 (72), razón por la cual uno de los sistemas para la expresión heteróloga de proteínas evaluados para la producción de IDS es la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, es comúnmente empleada para la síntesis y expresión de proteínas humanas ya que presenta patrones de glicosilación similares a los de humanos (85, 90).

3.12. Ventajas de la expresión de IDS y GALNS en *Pichia pastoris*

P. pastoris es un ascomiceto homotálico y es una de las levaduras metilotróficas que por su capacidad de crecer en metanol como su única fuente de carbono ha sido desarrollada desde 1984 como sistema para la expresión de genes heterólogos, debido al control de expresión que tiene el promotor AOX1 implicado en el metabolismo del metanol (22, 40). Aunque se han empleado como modelos biológicos de expresión otras levaduras metilotróficas como *Candida boidinii*, *Pichia metanolica* y *Hansenula polymorpha*, *P. pastoris* pasó de ser un modelo utilizado exclusivamente en aplicaciones industriales y biotecnológicas, hábil para producir altos niveles de biomasa en medios definidos simples a ser un sistema ampliamente utilizado para la expresión rápida de proteínas (90).

Las ventajas principales de *P. pastoris* con respecto a otros sistemas biológicos de expresión son:

- Obtención de altos niveles de expresión de proteínas debido a altas densidades celulares obtenidas (>100 g/L biomasa en peso seco; >400 g/L biomasa húmeda) en medio de cultivo simple (21).
- Secreción de proteínas a alto nivel (90).
- Implementación de fermentaciones a gran escala debido a que las condiciones de cultivo son ideales para la producción a gran escala de proteínas heterólogas y los componentes requeridos para el medio de cultivo (químicamente definido) son poco costosos, empleando fuentes de carbono como glicerol y metanol, biotina, sales, evidenciándose costos inferiores requeridos en los cultivos en células de mamíferos (22, 90).
- Estabilidad genética (90).
- Preferencia por crecimiento aerobio y poco fermentativa, en comparación con *S. cerevisiae*, por lo cual no genera niveles tóxicos de etanol y ácido acético en el medio encargados de reducir la producción de proteínas (22).
- Manifestación fenotípica de cualquier mutación genética que permite hacer una mejor selección de clones e interés (59).
- Ser un microorganismo competitivo ya que en condiciones favorables de cultivo, con una concentración constante de metanol y pH bajo, es menos frecuente la contaminación por otros microorganismos (22).
- Estabilidad por permitir el fácil almacenamiento de sus clones a largo plazo (22).
- Elaboración de modificaciones post-traduccionales, asociadas con organismos eucarióticos superiores, como procesamiento de las secuencias señal, plegamiento, formación de puentes disulfuro y N y O-glicosilación, pero a diferencia de *S. cerevisiae* los patrones de glicosilación son similares a los patrones de las proteínas de mamíferos y no se presenta

hiperglicosilación lo cual se constituye en su principal ventaja frente a otros sistemas procarióticos (22, 90).

3.13. Glicosilación de proteínas en *Pichia pastoris*

Las proteínas recombinantes expresadas en *P. pastoris* son glicosiladas con un patrón similar al de los organismos eucarióticos superiores, razón por la cual esta secuencia específica de oligosacáridos favorece que la proteína madura presente un plegamiento correcto y pueda llevar a cabo su función específica, de igual forma que las proteínas nativas. Esta glicosilación puede ser N-glicosilación u O-glicosilación (10, 41).

La N-glicosilación comienza en el retículo endoplasmático con la transferencia de un oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a partir de dolicol-fosfato a una asparagina en la secuencia Asn-X-Ser/Thr, por el complejo oligosacáriltransferasa. Después se liberan las tres glucosas y la manosa es removida por la $\text{Man}_9\text{-}\alpha\text{-manosidasa}$ generando de esta forma un oligosacárido $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (10).

El siguiente procesamiento de la proteína varía entre eucariotas superiores y las levaduras, en esta fase que ocurre en el complejo de Golgi se modifican las cadenas de residuos de manosa. Como se mencionó antes a diferencia de otras levaduras como *S. cerevisiae* donde las ramificaciones presentan cadenas de hasta 50-150 residuos de manosa, en *P. pastoris* no hay tal hiperglicosilación ya que generalmente se sintetizan ramificaciones e 8 ó 9 manosas, estructura madura $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNAc}_2$ similar a la sintetizada por los mamíferos como se muestra en la figura 5.

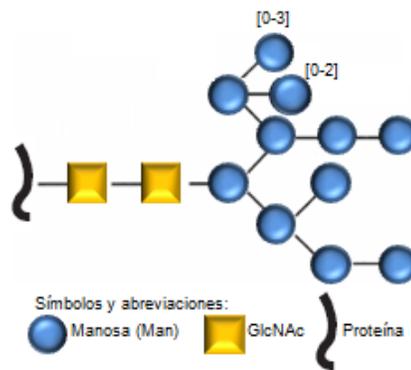


Figura 7. Estructura común de un N-oligosacárido sintetizado por *P. pastoris*, modificado de (10).

Los análisis realizados a las cadenas de oligosacáridos que *P. pastoris* sintetiza, han mostrado que la levadura no posee o no utiliza las α -1-3-manosiltransferasas para el procesamiento de las glicoproteínas, razón por la cual la estructura lineal de manosas es α -1,6 y las ramificaciones presentan exclusivamente unidades de manosa con enlaces α -1,2 (10) una gran ventaja sí se tiene en cuenta que al no presentar residuos de manosa con uniones α -1,3 se reduce la antigenicidad presentada en algunas de las proteínas expresada por *S. cerevisiae* (65).

También se ha encontrado correlación inversa entre la longitud de oligosacáridos con el número de sitios potenciales de N-glicosilación, además, otros factores que pueden incidir directamente sobre la N-glicosilación de la proteína, son la ubicación de la secuencia Asn-X-Ser/Thr en el polipéptido y la presencia de conformaciones que cubren los sitios de glicosilación (10).

En la O-glicosilación, que es el otro tipo de glicosilación que *P. pastoris* puede realizar en las proteínas, el oligosacárido es adicionado a los grupos hidroxilo de los aminoácidos serina y treonina, pero a diferencia de algunos mamíferos en los cuales la O-glicosilación de las proteínas están compuestos de azúcares variados incluyendo la N-acetilgalactosamina, ácido siálico y galactosa, en *P. pastoris* los O-

oligosacaridos están compuestos exclusivamente de cadenas de α -1,2-manosa y pueden existir casos en los cuales las proteínas no glicosiladas por sus hospederos nativos sufren esta glicosilación cuando son expresadas en la levadura (22).

Aunque se requiere el proceso de N-glicosilación en las proteínas heterólogas expresadas en *P. pastoris* en ocasiones se necesita su deglicosilación, para lo cual es posible emplear una enzima que reconoce las cadenas de manosa y cataliza la hidrólisis del enlace GlcNAc β -1,4 GlcNAc, es la Endo- β -N-acetilglucosamidasa H (endo H), (E.C. 3.2.1.96) o se puede utilizar una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces GlcNAc β -Asn, la glicopeptidasa F o PNGasa F (E.C. 3.5.1.52), (10).

Una de las estrategias utilizadas para reducir la glicosilación de proteínas que no la requieren, consiste en modificar la secuencia de aminoácidos en los puntos de glicosilación de forma que no se altere la funcionalidad de la proteína (14). Cuando se expresan proteínas humanas y se requiere que su patrón de glicosilación sea el más parecido a la proteína nativa para no alterar su plegamiento y la estabilidad de la estructura terciaria, pueden utilizarse cepas modificadas genéticamente que tienen la capacidad de llevar a cabo una glicosilación similar a la que se presenta en humanos (10, 16).

La razón por la cual las proteínas recombinantes humanas no pueden ser muy diferentes de las nativas es porque el plegamiento y la estructura terciaria son factores que pueden incidir sobre la funcionalidad “*in vivo*” con respecto a su solubilidad, sensibilidad a las proteínas, reconocimiento de las células específicas o interacción con los receptores de las células blanco (41).

Las enzimas lisosomales humanas producidas en *P. pastoris* pueden ser dirigidas a los macrófagos que expresen receptores de manosa o al tejido conectivo que

presente receptores de Man-6-P sí se producen fosforiladas, porque a diferencia de las glicoproteínas expresadas en líneas celulares de mamíferos como las células CHO, estas proteínas no presentan residuos de galactosa y ácido siálico que afecten su interacción (91).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Profundizar en el conocimiento de los efectos de la glicosilación sobre los niveles de producción de las enzimas IDS y GALNS humanas en células eucariotas superiores y las modificaciones que estas sufrirían al ser expresadas en la levadura *Pichia pastoris*.

4.2. Objetivos Específicos

1. Encontrar en la literatura científica modelos y rutas metabólicas de glicosilación llevada a cabo por las células eucariotas superiores y la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.
2. Reconocer la repercusión que tiene la glicosilación enzimática de la IDS y GALNS en *P. pastoris* frente a la eficiencia y los niveles de expresión de proteínas humanas recombinantes.
3. Establecer la incidencia de desordenes lisosomales registrados en la literatura científica en la población Colombiana especialmente de los síndromes de Hunter y de Moquio A.

5.1. METODOLOGIA

5.1. Criterios de Investigación

5.1.2. Formulación de la pregunta de investigación

¿El proceso de glicosilación proteica llevado a cabo por *P. pastoris*, esta correlacionado con la eficiencia en los niveles de expresión de las proteínas IDS_h Y GALNS_h cuando es empleada como sistema biológico de expresión?

5.1.3. Población Universal

Publicaciones en las cuales se reporta glicosilación y expresión de proteínas en la levadura metilotrófica *P. pastoris*.

5.1.4. Población de estudio

Artículos en los que se reporta el proceso de glicosilación y expresión de proteínas, incluyendo aquellos en los que se reporta expresión de la proteína humana recombinante IDS y GALNS en la levadura *P. pastoris*.

5.1.5. Intervención evaluada

Proceso de glicosilación de las enzimas IDS y GALNS humana expresada en la levadura *P. pastoris* en relación con Mucopolisacaridosis como los Síndromes de Hunter y Morquio A.

5.1.6. Variable dependiente

Mecanismo de glicosilación de las enzimas IDS_h y GALNS_h en *P. pastoris*.

5.2. Procedimiento para búsqueda de Información

Para realizar la búsqueda de información se empleó las bases de datos Taylor & Francis, Wiley InterScience, Science Journals (ProQuest), Science Direct (Elsevier), Medline (Consulta libre), SciELO (Scientific Electronic Library Online), disponibles en la red de la Universidad, con el fin de recopilar publicaciones cuyo objetivo fuese el estudio del mecanismo de glicosilación de las proteínas específicamente de la IDSh y la GALNSH en células eucariotas superiores y en la levadura *P. pastoris*. Los artículos fueron escogidos principalmente si estaban escritos en inglés, con algunas excepciones de artículos escritos en español y publicados en fechas entre los últimos 5 años, exceptuando algunos escritos desde el año 1982 (año del cual datan los primeros estudios realizados con *P. pastoris* como modelo biológico de expresión de proteínas). Se emplearon diversas combinaciones de los términos: *Pichia pastoris*, glicosilación, glicopéptidos glicoproteínas, receptor Man-6-P, mucopolisacaridosis, Hunter, Morquio A, biosíntesis, glicoproteínas, levaduras. Además, de artículos referenciados en literatura consultada, relacionados con el tema.

5.3. Definición de criterios para la selección de artículos

Los criterios para incluir artículos en la revisión preliminar, a partir de los proporcionados en la búsqueda fueron:

1. Que trataran de glicosilación de proteínas en sistemas eucariotas y procariotas.
2. Que trataran de la glicosilación de las enzimas IDSh y GALNSH en eucariotas superiores y en *Pichia pastoris*.
3. Que trataran de la importancia del receptor Man-6-P en el mecanismo de glicosilación de proteínas humanas.

4. Que trataran sobre los síndromes de Hunter y Morquio A y otras enfermedades y desordenes congénitos humanos asociados a mecanismos deficientes en la glicosilación.
5. Que trataran sobre manipulación genética de modelos biológicos como *P. pastoris* para explicar mecanismo de glicosilación de proteínas humanas.

Si el artículo cumplía con al menos 4 de los 5 criterios de inclusión fue preseleccionado, pero si el criterio faltante especificaba características de la proteína como peso molecular y mecanismo de glicosilación, estos datos se recopilaban de otras fuentes de información con el fin de preseleccionarlo y de no ser así el artículo se dejaba pendiente en otro sitio de ubicación y se disponía para posible descarte.

Estos criterios de inclusión se especificaron con el fin de recopilar las publicaciones en las cuales las proteínas mencionadas fueran la IDSh y la GALNSH o proteínas con un peso molecular afín que mostraran un proceso de glicosilación semejante.

5.4. Evaluación de artículos preseleccionados

En esta etapa se realizó una segunda revisión de los artículos preseleccionados con el fin de valorar su calidad científica y garantizar que sólo fuesen incluidos aquellos que tuvieran un nivel aceptable en la publicación, por lo cual se revisó cuidadosamente los materiales y métodos empleados, así como las variables de estudio tenidas en cuenta para la investigación, además de los resultados. En esta etapa del proceso se observaron de manera estricta las recomendaciones de los directores del trabajo de grado quienes definieron la selección de las publicaciones de interés con el fin de eliminar sesgos por subjetividad y/o inexperiencia.

5.5. Análisis de los resultados de la predicción computacional de la estructura terciaria de la IDS y GALNS

El análisis de los resultados obtenidos de la predicción computacional de la estructura terciaria de la IDS y GALNS realizados por Sáenz y Col. y Peña y Col. respectivamente, se emplearon como una herramienta útil para establecer semejanzas y diferencias teóricas del comportamiento físico, químico y biológico de las proteínas estudiadas, así como para realizar una aproximación conceptual de la relación existente entre el genotipo y la gravedad de la enfermedad que provoca la deficiencia de cada proteína.

5.5.1 Análisis computacional basado en la estructura primaria de la IDS y GALNS

Según predicciones computacionales elaboradas por Sáenz y Col. El tamaño de la ventana para los análisis con Protscale fue el básico de nueve aminoácidos. Para elaborar el perfil de hidrofobicidad emplearon el algoritmo de Kite y Doolittle que oscila entre valores de 3,0 y 4,0. Por medio del programa pI/MW se determinaron el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular; mediante el programa Netphos-2.0 se determinaron los sitios potenciales de fosforilación así como mediante los programas Net-Oglyc 3.1 y Net-Nglyc 1.0 se hallaron los sitios potenciales de O- y N- glicosilación. También, es posible obtener los bloques e impresiones de similitud (prints) a través del programa Finder motif, el perfil de antigenicidad empleando el programa JaMBW Chapter 3.1.7 y los alineamientos de secuencias mediante el programa BLAST de NCBI.

5.5.2. Modelos de estructura secundaria y terciaria y sitio activo

Para realizar la predicción de la estructura secundaria de las proteínas, Sáenz y Col. Emplearon las herramientas *Proteomics and Sequence Analysis* de ExPASy y la consolidación de resultados obtenidos con otros diez programas entre los cuales

reportan GOR, GOR1, GOR3, mmPred, Sspro, Casp, Meta-Predict, Fasta, SUB, rdb y Psi-Pred.

De la misma manera, para la predicción de la estructura terciaria de las proteínas, Sáenz y col. emplearon las herramientas *Proteomics and Sequence Analysis* de ExPASy para obtener la secuencia que fue utilizada por programas computacionales, los programas son: SWISS-MODEL, Geno3d, CPH models, 3D-PSSM, ProSup, SWEET y CPH Models 2.0: X3m, este ultimo empleado para extraer el modelo tridimensional. Para obtener fragmentos de otras moléculas con secuencias similares a las de la IDS_h utilizaron el programa BLAST. Aquellos segmentos peptidicos que no fueron determinados computacionalmente, los construyeron con el programa Swiss-PDBviewer (Spdbv) 3.7, que permitió adicionar manualmente cada uno de los residuos basado en la predicción de la estructura secundaria. Por último y con el fin de minimizar la energía de la estructura se empleo el programa Discover 3 del paquete Insight II de 2004 en un computador Silicon Graphics Octane. Para visualizar la estructura tridimensional se emplearon los programas RasMOL 2.6 y Spdbv 3.7.

Para la determinación del sitio activo, Sáenz y col. Se basaron en la comparación de estructuras teóricas y computacionales obtenidas de otras sulfatasas.

5.5.3. Cálculo de raíz media cuadrática

La RMS es una medida cuadrática que permite establecer la diferencia en la distribución, cuya expresión matemática es:

$$RMS = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} \quad [1]$$

Según los estudios realizados por *Sáenz y col.* los valores para los átomos menores o iguales a 1 representan moléculas con alta similitud estructural y permite tener una aproximación teórica y computacional de las mutaciones puntuales en la proteína.

6. RESULTADOS

6.1. Selección de artículos

Los artículos que superaron las dos etapas de selección fueron 173 (100%) publicaciones, como resultado de las búsquedas realizadas en las bases de datos consultadas. Con la lectura del resumen del artículo y sólo cuando fue necesario con la lectura de materiales y métodos y los resultados obtenidos, se identificaron 142 (82,1%) artículos cuyo objetivo de investigación fue la glicosilación de proteínas en *P. pastoris*, los restantes (17,9%) aunque tenían enfoque clínico no estaban relacionados con los efectos sobre la salud de las deficiencias de glicosilación de proteínas para los casos específicos de Mucopolisacaridosis II y IVA, Síndromes de Hunter y Morquio A respectivamente.

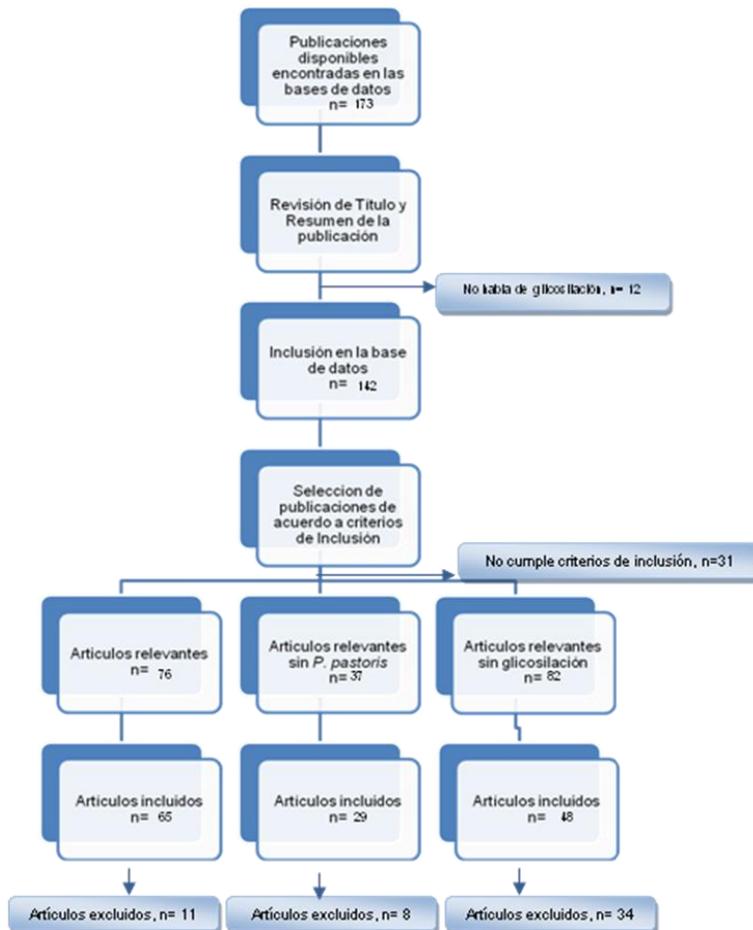


Figura 8. Metodología empleada para la búsqueda de la información.

6.2. Glicosilación, secreción y nivel de expresión de las proteínas

Se encontró que la eficiencia en el transporte de una proteína recombinante desde el RE al medio extracelular es una etapa importante para su procesamiento correcto y el nivel de expresión, por lo cual no debe utilizarse el péptido señal de la proteína heteróloga ya que es posible que no sea reconocido ni procesado por la levadura. Debido a que la señal de secreción está directamente relacionada con el paso del polipéptido nascente a través de la membrana del RE y la interacción con las moléculas de la vía de secreción (6, 86).

Expresar proteínas recombinantes humanas en levaduras utilizando péptidos señales de otras levaduras en reemplazo de los nativos heterólogos, favorece el procesamiento correcto del mismo, la interacción con las proteínas auxiliares del RE para la formación de puentes disulfuro, el plegamiento y transporte por la vía de secreción, debido a que las proteínas involucradas en el proceso son diferentes en levaduras con respecto a los eucariotas superiores (45, 93). De no presentarse el procesamiento correcto de la proteína cuando es sintetizada precedida de su secuencia señal nativa, podría generarse una proteína termodinámicamente inestable debido a las modificaciones en la energía libre de Gibbs y sería susceptible a ser digerida por proteínas intracelulares, afectando de esta manera la recuperación de la proteína de interés en el medio extracelular (49).

El péptido líder conocido como α -factor o α -MF es el precursor de una proteína de 13 AA secretada por *S. cerevisiae*, de gran importancia en el sistema secretorio de la levadura ya que cumple la función de facilitar el transporte de la proteína a través del RE y el aparato de Golgi antes de su disposición en las vesículas de secreción. El α -factor es codificado por el gen estructural MF α 1 y su secuencia completa consta de 85 AA (5, 59). Los primeros 19 AA corresponden al péptido señal, una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos que permiten el transporte del polipéptido

naciente a través de la membrana del RE. Esta señal es identificada por la partícula de reconocimiento del péptido señal (SRP) con la cual se desplazan hacia el traslocón de la membrana donde el polipéptido se transporta desde el ribosoma a la luz del RE y una vez que la pro-proteína se ha incorporado, la secuencia señal es hidrolizada por la peptidasa de reconocimiento del péptido señal (35).

Los 66 AA siguientes del α -factor, corresponden a la región pro, segmento que se caracteriza por tener tres sitios potenciales de N-glicosilación en los aminoácidos 4, 38 y 48. Cuando la pro-proteína es liberada del péptido señal dentro del RE las respectivas cadenas de oligosacaridos son unidas a los tres sitios de N-glicosilación y de esta forma se favorece el transporte de todo el péptido hasta el aparato de Golgi. Una vez que la proteína está unida a la secuencia líder llega al aparato de Golgi, las cadenas de oligosacaridos sufren las modificaciones de cualquier glicoproteína antes que la proteína madura sea liberada del prosegmento por la acción proteolítica de la endopeptidasa Kex2 (E.C. 3.4.21.61) en el extremo amino terminal de la secuencia Arg-Lis, contiguo al segmento “spacer” en el que se repiten los aminoácidos Glu-Ala (21). Finalmente la enzima dipeptidil aminopeptidasa Ste13 (E.C. 3.4.14.4) es la encargada de llevar a cabo un corte rápido entre la secuencia de repetición Glu-Ala y proteína madura. Desde que se identificó este procesamiento y los mecanismos de secreción para este péptido líder se implementó su aplicación para síntesis de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae* y posteriormente en *P. pastoris* debido a que la secuencia es procesada de igual forma en ambas levaduras (22, 35).

Las moléculas involucradas en la vía de secreción de proteínas en *P. pastoris* son capaces de reconocer la secuencia líder α -MF propia de *S. cerevisiae*, lo cual indica que las diferencias en el mecanismo de secreción de estas dos levaduras es mínimo y que los niveles de proteína expresada con α -MF son superiores comparados con

los obtenidos utilizando un péptido señal de la fosfatasa ácida (E.C. 3.1.3.2) enzima expresada por el gen PHO1, una enzima de *P. pastoris* (90).

De igual forma se pudo determinar que la ventaja que ofrece el péptido señal α -MF sobre el péptido señal PHO1 y los péptidos nativos heterólogos, podría centrarse en los tres sitios potenciales de glicosilación que posee la prosequencia. Gracias a los oligosacaridos unidos al péptido, en el RE se favorece el transporte de las proteínas hacia el complejo de Golgi y de ahí a las vesículas de secreción. Esta hipótesis la respalda el estudio de Sagt *et al.* (93) en el que se realizaron modificaciones en los tres sitios de N-glicosilación del α -factor, para la expresión de una proteína recombinante en *S. cerevisiae* y se encontró que las mutaciones en las secuencias Asn-X-Ser/Thr generaban reducciones drásticas en la secreción de la proteína, lo que evidenció la importancia del papel de estos N-oligosacaridos en el transporte de la proteína recombinante (93).

Es importante tener en cuenta que la sola presencia de la N-glicosilación no determina la secreción de la proteína recombinante, pues cuando la N-glicosilación está más próxima a la proteína, mayor es su repercusión sobre el nivel de secreción, a diferencia de lo que ocurre cuando se glicosilan los sitios más cercanos al extremo N-terminal de la secuencia líder (79); efecto que posiblemente se deba a la interacción entre las regiones glicosiladas y la proteína madura, contribuyendo a la estabilidad de la molécula durante la secreción (79). La ausencia de una prosequencia con diferentes puntos de N-glicosilación puede ser un factor que incida sobre los niveles de expresión obtenidos cuando las proteínas tienen como péptido líder su señal de secreción nativa, posiblemente por una disminución en el reconocimiento e interacción de la vía secretoria de la levadura con el péptido foráneo (6, 90).

La N-glicosilación además, de ser necesaria en el péptido líder, desempeña un papel importante en la estructura de la proteína como se muestra en el estudio de Parodi *et al.* (79), en el cual expresaron la N-acetilgalactosamina en *P. pastoris*. En este trabajo el efecto de las mutaciones en los sitios potenciales de N-glicosilación mostró que cuando no existían N-oligosacáridos el nivel de expresión fue mucho menor que en el caso contrario y además demostró que en función del sitio mutado el efecto sobre la secreción era más o menos notorio (72). En todos los casos la enzima era expresada, no obstante las modificaciones generadas por la ausencia de los oligosacáridos que propiciaron una acumulación en algunos organelos de la levadura como las vacuolas o el complejo de Golgi sugiriendo que la N-glicosilación es un factor crítico en el procesamiento correcto y la secreción de la proteína (79).

Con el fin de asegurar la secreción de la enzima, la N-glicosilación puede facilitar un plegamiento correcto de las proteínas durante la biosíntesis, lo que no sucede con la O-glicosilación que no tiene la misma repercusión. La subunidad β de la gonadotropina coriónica cuenta con cuatro O-oligosacáridos en el extremo C-terminal del polipéptido y sin embargo, el nivel de expresión que se obtuvo fue inferior al logrado por la subunidad α , que no presentaba este tipo de glicosilación. Con respecto a la O-glicosilación se han realizados estudios con resultados aun no documentados acerca de la evidencia de si las alteraciones en los O-oligosacáridos afectan el nivel de secreción de las mismas (41).

Existen factores diferentes a las modificaciones que afectan los sitios de N-glicosilación que pueden tener incidencia sobre la secreción eficiente de las proteínas. De las proteínas reportadas en los artículos revisados, la que presentaba más sitios de N-glicosilación fue aquella que mostró mayor nivel de expresión como se muestra en la tabla 2 (107).

Tabla 2. Publicaciones incluidas en las que se relaciona: N-glicosilación, peso molecular y el nivel de expresión de la proteína.

<i>Autor y año</i>	<i>Proteína</i>	<i>Glicosilación</i>	<i>KDa</i>	<i>Nivel de Expresión</i>	
				<i>mg/L</i>	
				<i>Nativa</i>	<i>α-MF</i>
Lin, S.H. <i>et al.</i> 2009 (62)	Gonadotropina coriónica subunidad α	Si	~18	0.3	24
	Gonadotropina coriónica subunidad β	Si	~30	0.27	2.7
Vad, R. <i>et al.</i> 2005 (94)	Lisozima	1 sitio N-glicosilación	~14	0.9	6.4
Lin, S.H. <i>et al.</i> 2009 (62)	Gelatinasa B truncada	3 sitios N-glicosilación	45-48	50	300
Gemill, T.R. 1999 (39)	Prolil 4-hidroxilasa	2 sitios N-glicosilación	~70	0.77	10
	Activador GM2	1 sitio N-glicosilación	~25	2	21
Sreekrishna, K. <i>et al.</i> (1996)	Procarboxipeptidasa A2	Si	45	0	250
Poutou, R. <i>et al.</i> 2005 (83)	IDS	7 sitios N-glicosilación	~58	~20	4.0
Rodríguez, A. <i>et al.</i> 2010 (88).	GALNS	2 sitios N-glicosilación	~59	~4.29	

A diferencia de lo ocurrido con el activador GM2, que presenta un sólo sitio de N-glicosilación (41) pues se obtuvo un mayor nivel de expresión que en la subunidad α de la Prolil-4-hidroxilasa (E.C. 1.14.11.2) que tiene dos sitios de N-glicosilación. En una publicación, donde se detalla la expresión de la lisozima (101) el nivel de expresión fue superior al obtenido con otras proteínas glicosiladas, pese a que no se menciona que esta enzima haya sufrido glicosilación. En este tipo de casos deben considerarse otros criterios como el peso molecular, que también puede tener un efecto importante sobre el nivel de expresión (41).

Por otra parte se identificó que el peso molecular de la enzima es un factor determinante en los procesos de glicosilación y de expresión. Según las publicaciones revisadas (79), el péptido señal influye en la eficiencia del paso de un polipéptido de tamaño corto a través de la membrana del RE, debido a que el líder es capaz de mediar un transporte rápido y la siguiente estabilización de la proteína en el lumen (79). Si la proteína no es muy grande el proceso de secreción puede ser más rápido porque su transporte es más sencillo para la célula. Esto se evidencia en las publicaciones de ensayos en los que se emplearon proteínas con un peso molecular promedio de 45kDa y el proceso de secreción fue más sencillo para la levadura que en el caso de la subunidad α de la Prolil 4-hidroxilasa (E.C. 1.14.11.2), con peso molecular de 70 kDa (41). Otros ejemplos que demuestran que el peso molecular si incide directamente sobre los niveles de expresión es el de las dos subunidades de la gonadotropina coriónica, en el que se recuperó mayor cantidad de proteína expresada de la subunidad α que es 12 KDa de menor tamaño que la subunidad β , o en el caso de la expresión de la forma truncada de la gelatinasa B donde se observó que al producir esta proteína con un peso molecular entre 45 y 48 KDa se obtuvo un nivel de expresión más alto que cuando se expresó con la forma completa de 90 KDa en condiciones similares de cultivo (66).

Otro factor que se considera importante en la expresión de proteínas humanas en modelos biológicos es la optimización del medio de cultivo en el cual se hace la inducción para la producción de la proteína de interés. En el caso de la expresión de IDShr en *P. pastoris Poutou* y *Col.* (83) seleccionaron 7 de 178 clones de la levadura, obteniendo la mejor actividad IDS con el clon 28 el cual produjo 4.21 nmol/h mg al crecer en medio de cultivo YPG, razón por la cual fue seleccionada para la producción de IDShr empleando glicerol como fuente de carbono y energía hasta obtener 12.08 g/L de biomasa seca, finalmente, para el paso de inducción emplearon un medio de cultivo enriquecido con metanol que actúa sobre el

promotor nativo *AOX1*. La actividad específica reportada osciló entre 25.4 y 29.36 nmol/mg h. superior comparada con el valor de referencia para la IDS en plasma humano que es 12.58 nmol/mg h (83). Contrario a lo que sucedió en el trabajo de Rodríguez y Col. Donde se obtuvo un nivel de expresión de la proteína GALNSr de 4.29 mg/L producida en el clon *E. coli BL21* (88).

Un factor importante en el nivel de expresión es el número de copias del gen integradas en el genoma de la levadura, en el estudio de Lin *et al.* (66) se seleccionaron los clones con más de una copia del gen que codifica para la gelatinasa B (E.C. 3.4.24.35), porque representaban mayor probabilidad de lograr niveles mayores de secreción de la proteína recombinante, obteniendo el aumento en el nivel de glucoamilasa expresada cuando emplearon un clon con mayor número de copias del gen. Sin embargo, este efecto sobre la proteína expresada es impredecible y el incremento en el número de copias no siempre genera un aumento significativo en el nivel de expresión.

La secuencia “spacer” es importante en el procesamiento final de la proteína debido a que favorece la reducción de su interferencia estérica, logrando una eliminación eficiente de la prosequencia por la acción de la Kex2 (E.C. 3.4.21.61). En el caso de la procarboxipeptidasa A2 (E.C. 3.4.17.15) se observó diferentes secuencias N-terminales en la proteína por lo cual se cree que la enzima Kex2 no hidrolizó el total de las secuencias y por esta razón otras endoproteínas pudieron ser causantes de cortes inespecíficos (95).

Sin embargo, es posible mejorar el procesamiento de la prosequencia con el fin de aumentar la eficiencia del proceso de hidrólisis por la endopeptidasa Kex2, favorecer la auténtica secuencia N-terminal y aumentar el nivel de expresión, como lo demostró los estudios de Kjeldsen *et al.* para la secreción del precursor de la

insulina en el cual eliminaron el segmento espaciador y obtuvieron proteína, cuando adicionaron otro segmento (EAEPK) observaron un incremento en el rendimiento como sucedió con el interferón β 1. De esta forma se entiende que la forma como estas modificaciones optimizan el mecanismo de procesamiento por la endoproteasa aun no está dilucidado totalmente pero una explicación podría consistir en las condiciones de hidrofiliidad que proporciona la glutamina en el dipeptido, con lo cual mejoraría el procesamiento de la Kex2 (57).

Se reporta en artículos revisados que la prosequencia de una proteína es capaz de incidir sobre la actividad biológica, el procesamiento, correcto plegamiento y la secreción si no es eliminada completamente, después de haber pasado por el aparato de Golgi. De hecho, además de afectar la proteína, la presencia de segmentos adicionales en el péptido líder influye negativamente disminuyendo la eficiencia de la secreción porque mientras más eficaz es un péptido líder, las proteínas presentan un transporte más rápido cuando se dirigen desde el RE hasta la cara trans del complejo de Golgi, por esta razón se han diseñado modificaciones en las señales de secreción con el fin de mejorar su funcionalidad y de esta forma incrementar los niveles de expresión, creando una señal de secreción sintética y obteniendo niveles de expresión la proteína recombinante de hasta 3 ó 6 veces mayor en comparación con la señal de secreción nativa (41).

Como se ha observado, la secuencia líder presenta una estructura que facilita el reconocimiento y procesamiento en el sistema de secreción de la levadura, también, se ha observado que el incremento en el número de residuos cargados negativamente o hidrofóbicos en el área próxima al sitio de procesamiento del pro-péptido líder o la adición de puntos de N-glicosilación adicionales, es crucial para aumentar los niveles de secreción de la proteína recombinante (95).

Se sabe que las proteínas plegadas incorrectamente no son transportadas al complejo de Golgi, pues son retenidas en el RE y eventualmente llevadas al citosol donde son degradadas en el proteosoma (69). Cuando una proteína no presenta grandes errores en el plegamiento pero es termodinámicamente inestable es transportada a las vacuolas por un receptor ubicado en las membranas del aparato de Golgi y posteriormente degradada. Se observó que después del corte proteolítico por la enzima Kex2 en la cara trans de Golgi, las proteínas que no se exportan en vesículas al medio extracelular pasan a un compartimiento post Golgi que restringe la secreción si no se ha presentado el plegamiento correcto (97).

Al mantener la señal de secreción, es posible que la enzima IDS no experimente el plegamiento correcto o ciertas conformaciones estructurales que son fundamentales para su secreción, pues se ha demostrado que cuando se altera la formación de α hélices o puentes disulfuro las proteínas no son secretadas; mecanismo ha sido estudiado en detalle en *S. cerevisiae* (59).

Por último, se sabe que otro fenómeno que puede afectar la secreción correcta de las enzimas IDShr y GALNShr, es la identificación del péptido señal nativo por parte de la enzima de reconocimiento en la membrana del RE (E.C. 3.4.21.89). Si esta enzima reconoce la señal y la hidroliza, se estaría separando la secuencia madura de la IDS de la prosequencia del α -MF y en este caso las ventajas que esta señal de secreción proporciona, no tendrían influencia alguna en la secreción de la enzima (59).

Este reconocimiento por parte de la peptidasa señal I (E.C. 3.4.21.89) es posible porque no exista ninguna especificidad de esta enzima por una secuencia de aminoácidos, sino, que su acción está dirigida a la hidrólisis en el extremo terminal de la región más hidrofóbica del péptido. Otra de las posibilidades que se

presentarían en caso de que la peptidasa señal I reconozca el péptido señal de la IDS es la exposición de la pro-secuencia de la IDS, que puede actuar como señal para enviar la enzima al lisosoma, en este caso los residuos de la manosa 6 serían fosforilados y la proteína no se secretaría sino que se acumularía en los lisosomas (85).

6.3. Análisis de los resultados de la predicción computacional de la estructura terciaria de la IDS y GALNS

6.3.1. Análisis computacional basado en la estructura primaria de la IDS y GALNS

Según las predicciones teóricas y computacionales elaboradas por Sáenz y Col. se determinó que la composición de la secuencia de aminoácidos de la IDS_h fue 29 A, 24 R, 39 D, 21 N, 6 C, 23 Q, 24 E, 29 G, 15 H, 22 I, 55 L, 19 K, 8 M, 28 F, 49 P, 41 S, 21 T, 7 W, 26 Y y 31 V. Los perfiles computacionales mostraron que la proteína tiene una estructura con alto porcentaje de accesibilidad, poco hidrofóbica y muy flexible. En el mismo estudio, el análisis computacional determinó que el punto isoeléctrico fue 5,15 y el peso molecular 58, 479 kDa; se encontraron 26 sitios potenciales de fosforilación, 61 sitios potenciales de O-glicosilación y 7 sitios potenciales de N-glicosilación (**Figura 9**).

En este mismo trabajo se encontró que el tamaño de los *prints* era mucho más grande que el de los bloques aunque sean secuencias similares. De cinco moléculas con similitud en los *prints* y de 114 con bloques similares a secuencias de la IDS_h, sólo dos sulfatasas presentaron una estructura tridimensional determinada experimentalmente. Estas moléculas son la ARSA (E.C. 3.1.6.8.) y la ARSB (3.1.6.12.) con números de acceso en NCBI P15289 y P15848 respectivamente que alineadas con la secuencia de la IDS_h tenían porcentajes de similitud de 26 y 24%.



Figura 9. Secuencias aminoacídicas de IDSh y GALNSh. A. Secuencia aminoacídica de la IDSh. B. Secuencia aminoacídica de la GALNSh. En rojo aminoácidos del péptido señal, en azul residuos de la proproteína, en verde sitios potenciales de N-glicosilación, en morado secuencia de la ARSA; en naranja secuencia de la ARSB.

Según las predicciones teóricas y computacionales elaboradas por *Peña y col.* se determinó que la composición de la secuencia de aminoácidos de la GALNSh fue 46 A, 12 M, 23 V, 28 T, 25 R, 24 Q, 59 L, 27 S, 46 G, 41 P, 23 N, 21 I, 24 D, 25 E, 24 F, 8 C, 19 H, 17 K, 16 Y, 15 W. Los perfiles computacionales mostraron que la proteína tiene una estructura con alto porcentaje de accesibilidad, poco hidrofóbica y muy flexible (**Figura 10**).

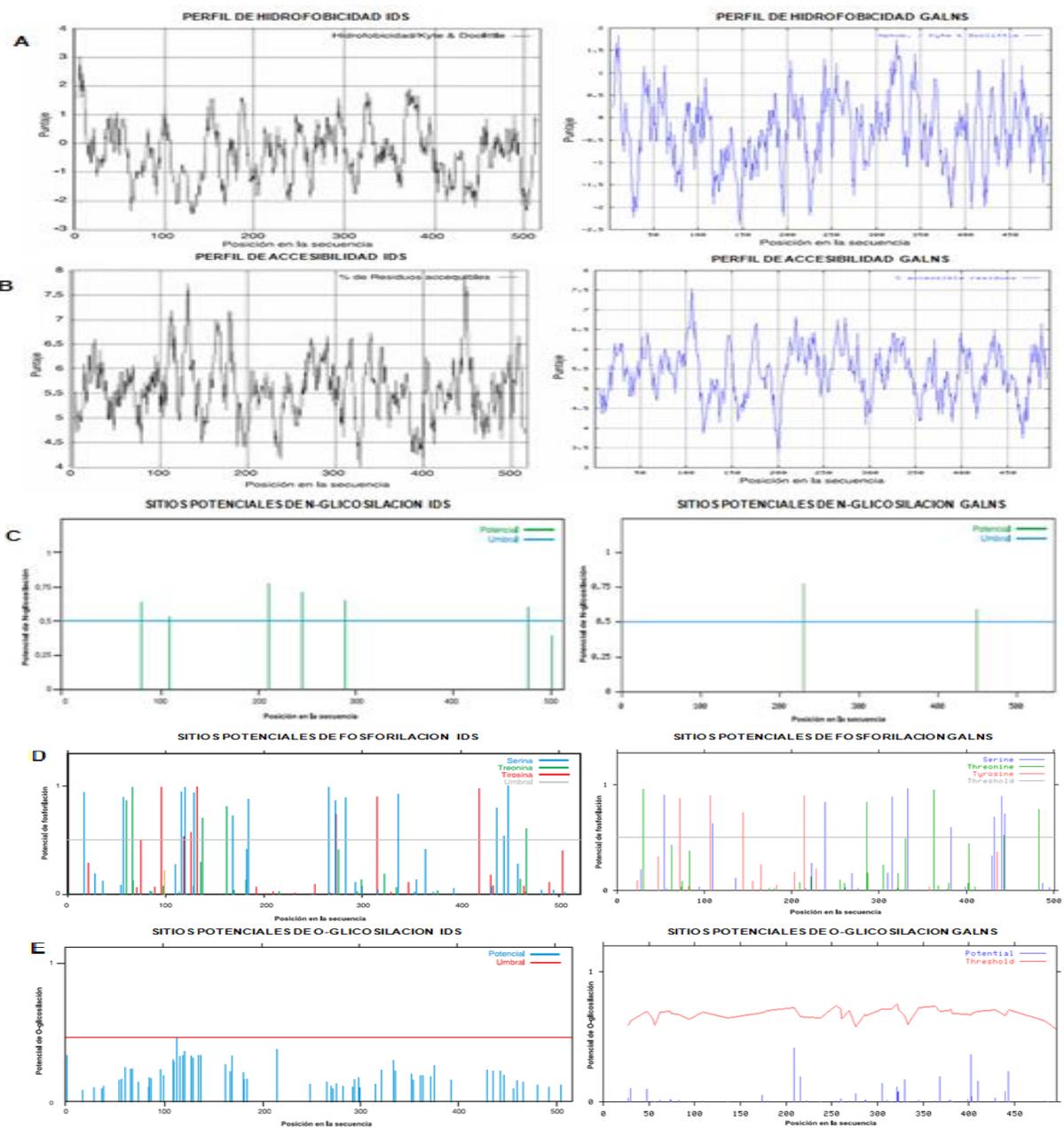


Figura 10. Perfiles de la IDSh y GALNSh. A. Perfil de hidrofobicidad de la IDSh y GALNSh. B. Perfil de accesibilidad. C. Sitios potenciales de N-glicosilación, utilizando el programa NetNGlyc 1.8. D. Sitios potenciales de O-glicosilación, utilizando el programa NetNGlyc 3.1. E. Sitios potenciales de Fosforilación, utilizando el programa NetPhos 2.0, modificado de Sáenz, 2007 (92).

En el mismo estudio, el análisis computacional determinó que el punto isoeléctrico fue 6,73 y el peso molecular 59, 124 kDa; se encontraron 18 sitios potenciales de fosforilación, 46 sitios potenciales de O-glicosilación y 2 sitios potenciales de N-glicosilación, como se ve en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de las predicciones computacionales de las moléculas IDSh y GALNSh

<i>Perfil de la Molécula</i>	<i>IDS</i>	<i>GALNS</i>
Perfil de hidrofobicidad	Bajo	Bajo
Perfil de flexibilidad	Alto	Alto
Perfil de accesibilidad (%)	Alto	Alto
Punto isoeléctrico (pI)	5,15	6,73
Peso molecular (kDa)	58,479	59,124
Sitios potenciales N-glicosilación	7	2
Sitios potenciales O-glicosilación	61	46
Sitios potenciales de Fosforilación	26	18

6.3.2. Modelos de estructura secundaria y terciaria y sitio activo

De acuerdo a los resultados obtenidos empleando los diferentes programas, las publicaciones (80) muestran que se construyó la estructura secundaria de la IDSh, para la cual específicamente en el estudio de *Saenz y col.*, los programas GOR, GOR-1 y GOR-3 predijeron para hélice, enrollamiento al azar, hoja plegada y vueltas beta (beta turn); los programas Sspro y Casp lo hacen para hélice, hoja plegada y enrollamiento al azar; los programas Meta pred, Fasta SUB y sdb para regiones en hélice, hoja plegada y lazos al azar (loops). Los lazos y vueltas se homologaron con enrollamiento al azar por lo cual el esquema hallado por *Saenz y col.* se hizo sólo basado en hélice 33%, hoja plegada 13 % y enrollamiento al azar 54

%, mientras que la construcción de la GANLS_h elaborada por *Peña y Col.*, se determinó hélice 23,5%, hoja plegada 13,3 % y enrollamiento al azar 63,2 %.

Para la predicción de la estructura terciaria el programa SWISS-MODEL les proporcionó a los investigadores dos secuencias por similitud con las estructuras determinadas experimentalmente que corresponden a las secuencias de la ARSA y ARSB. El programa BLAST permitió la elaboración del modelo a partir de múltiples alineamientos realizados previamente y empleando la Protein database (PDB) para comparar secuencias similares que para el caso de la IDS_h fue de 17 fragmentos con identidades entre 21 y 52%. El programa Spdbv permitió adicionar manualmente residuos que no se encontraban en ese fragmento guiándose por la orientación de la predicción secundaria de la estructura.

La predicción del sitio activo realizada por *Saenz y col.*, se realizó consensuando los resultados teóricos y los computacionales y basándose en que las sulfatasas en general para su activación requieren modificaciones postraduccionales que se llevan a cabo en el RE cuando se transforma el residuo de cisteína en FGly, los residuos ubicados cerca de la cisteína componen el centro activo de la ARSA y ARSB los cuales presentan homología con los de la proteína.

6.3.3. Cálculo de raíz media cuadrática

Los valores obtenidos por *Sáenz y col.* para la ARSA y la ARSB fueron 0,78 y 0,86 respectivamente, comparados con el modelo de estructura terciaria de la IDS_h y los obtenidos por *Peña y col.* demuestran que la GALNS_h reportó valores inferiores a 0,1 posiblemente debido a que los análisis estructurales de cada mutación de esta enzima respecto la estructura nativa no muestran una gran variación.

6.4. Expresión en células humanizadas de *Pichia pastoris*

Gracias a los aportes que ha realizado la ingeniería genética al tratamiento de múltiples enfermedades humanas ligadas a procesos de glicosilación deficientes, es posible contar con protocolos establecidos y en continuo desarrollo que permitan pensar en un tratamiento eficaz de las MPS como los Síndromes de Hunter y de Morquio A.

Contreras y Col., encontraron la forma de manipular “in vivo” el sistema de glicosilación de una cepa modificada de *P. pastoris* para producir estructuras de glicanos cortas en una glicoproteína de interés. Los glicanos resultantes fueron: Man₈GlcNAc₂ (GlycoSwitch-M8), Man₅GlcNAc₂ (GlycoSwitch-M5), GlcNAcMan₅GlcNAc₂ (GlycoSwitch-M5Gn), GalGlcNAcMan₅GlcNAc₂ (GlycoSwitch-M5GnGal), los cuales tienen la misma estructura e intermediarios presentes en la N-glicosilación de mamíferos. En este estudio los plásmidos contruidos a partir de la glicosilación en levaduras metilotróficas se emplearon para producir glicoproteínas con estructuras cortas y que contienen estructuras complejas al exterior de la cadena (52, 102).

De acuerdo al patrón de glicosilación de una proteína y sabiendo que es dependiente del tipo celular que la produce, es posible pensar en la modificación de éste para incorporarlo posteriormente en una célula modificada que exprese la proteína de interés (52, 102). Así, es posible saber que el patrón de glicosilación de la enzima deficiente en la enfermedad Morquio A presenta un bajo o nulo reconocimiento de las proteínas en la células óseas y cartilagosas debido a la deficiente distribución de la enzima en estos tejidos al ser aplicada de forma intravenosa sin traspasar la barrera hematoencefálica y que en el caso contrario de la insuficiencia de la IDS aunque existe deficiencias en el reconocimiento de su patrón de glicosilación en células musculares y óseas si traspasa la barrera hematoencefálica comprometiendo el cerebro y la inteligencia de la persona. Dicho

de otra forma, no se lleva a cabo el proceso de endocitosis de estas enzimas que es mediado por el receptor manosa 6-fosfato y que es el encargado de dirigir de manera específica las enzimas a los lisosomas siempre y cuando estas tengan expuestos en sus cadenas residuos de manosa.

Cada paso en la creación de la cepa modificada por *Contreras y Col.*, necesita la construcción de cadenas complejas con una galactosa terminal que modifique la actividad de la glicosidasa y la glicosiltransferasa en el RE y complejo de Golgi para lo cual integra 5 plásmidos que contienen un marcado de resistencia a diferentes antibióticos dominantes, los 5 antibióticos son: blasticidina, zeocina, higromicina, geneticina e higromicina (52, 102).

El Kit empleado en el estudio propuesto por *Contreras y Col.*, cuenta con un vector capaz de expresar en una levadura metilotrófica una α -manosidasa I, una glicosidasa II, un vector capaz de desestabilizar el gen *ch1*, un vector capaz de expresar una α -manosidasa I y una glicosidasa II al tiempo y demás combinaciones resultantes. También cuenta con una secuencia de nucleótidos que codifican y pueden expresar proteínas heterólogas y una levadura metilotrófica que puede ser transformada con cualquier vector de entrada o salida. De esta forma el Kit puede incluir un plásmido con una secuencia de nucleótidos que codifiquen para una proteína heteróloga de interés para clonarla y expresarla en una levadura de las características de *P. pastoris* (52, 102).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Es importante tener en cuenta que la información recopilada está basada en la evidencia y representa una aproximación teórica que debe ser complementada con estudios experimentales posteriores, que corroboren si los criterios expuestos son válidos para la expresión de la IDShr y la GALNShr u otras proteínas humanas glicosiladas de características similares en *P. pastoris*.

Como describió este análisis a partir de la información recopilada, son varios los factores que inciden en un eficiente procesamiento de las proteínas en *P. pastoris*, como la glicosilación y nivel de secreción y expresión; aunque, las propiedades biofísicas que determinan la secreción eficiente de una proteína específica no están del todo claras, la estabilidad del plegamiento termodinámico podría ser un factor crítico, que también podría depender del correcto procesamiento que sufra el péptido líder antes de que la proteína llegue a la cara *trans* del aparato de Golgi (10).

Aunque existe información acerca de la transformación de las glicoproteína en las levaduras, aun existen algunos vacíos. Comprender el procesamiento de las glicoproteínas es importante por varias razones. Muchos de los procesos son altamente conservados entre levaduras y otros hongos, así como entre levaduras y mamíferos, aunque las estructuras implicadas no están directamente conservadas. La determinación de estas estructuras en los organismos patógenos puede dar pistas para el desarrollo de fármacos, y puede ser importante como indicadores de diagnóstico de enfermedades. De hecho los estudios de Gemmill *et al.* (41), infieren que la naturaleza de los enlaces O-glicosídicos podrían ser la ventaja biotecnológica que tienen los hongos por la adición de la Manosa a los O-glicanos en lugar de azúcares de N-acetilhexosamina adicionados en otros eucariotas estudiados (41).

Los estudios han demostrado que las vías de la N-glicosilación en *P. pastoris* pueden ser extensamente rediseñadas sin comprometer la viabilidad de las células hospedero y ocurre gracias a que la célula debe usar la N-glicosilación para la síntesis de su propia pared celular y no existen precedentes acerca de en qué medida la formación de los glicanos de tipo híbrido podrían poner en peligro la viabilidad de la levadura (10).

Además, la función del sustrato limitante de azúcar transportadores demuestra que la ausencia de estos transportadores conduce a la ineficiencia de la GlcNAc de transferencia, tal vez, por las cantidades limitantes de UDP- GlcNAc en el aparato de Golgi de *P. pastoris* (10, 20, 24, 58, 64, 70). Las cadenas de *P. pastoris* modificadas genéticamente tienen la capacidad de llevar a cabo una segunda modificación al producir complejos N-oligosacaridos, lo que sumado a la habilidad de *P. pastoris* para expresar grandes cantidades de proteínas, la ha convertido en un modelo ampliamente estudiado por la industria farmacéutica (10, 20, 24, 58, 64, 70).

El papel que juega el procesamiento de los carbohidratos en el plegamiento de las glicoproteínas se ha establecido por medio de ensayos “*in vivo*” como lo demostró Trombetta *et al.* (100) en sus estudios donde propone que la reglicosilación se convierte en una herramienta útil para la manipulación de las glicoproteínas. Las proteínas siguiendo la ruta de secreción adquieren la estructura terciaria adecuada y en algunos casos también la estructura cuaternaria en el ER. Aquellas que presentan un plegamiento incompleto son retenidas en el RE y degradadas con el tiempo. Uno de los mecanismos moleculares por el cual las células adquieren su conformación son los N-glicanos monoglicosilados ($\text{Glc}_1\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$) presentes en las glicoproteínas nacientes en el RE y con el fin de regular la abundancia de las

estructuras de N-glicanos se proponen dos mecanismos importantes como los son la deglicosilación llevado a cabo por la glucosidasa II (E.C. 3.2.1.20) y la reglicosilación por la glicosiltransferasa (E.C. 2.4.1.117), (100).

Por otro lado el plegamiento de las proteínas es propenso a sufrir complicaciones en su proceso. Numerosos mecanismos, se encaminan a juntar esfuerzos para garantizar que las proteínas recién sintetizadas lleguen a tener un plegamiento correcto y así alcanzar su funcionalidad (42, 100). Las características del lumen del RE divergen de las características de otros compartimientos celulares, como el citosol o la mitocondria. El lumen es rico en Ca^{2+} el cual es utilizado por varias chaperonas para facilitar el plegamiento de la proteína, que influye directamente en la actividad enzimática. El RE también provee un ambiente oxidante, rico en enlaces disulfuro que se encuentran apoyados en las proteínas de la familia disulfuro isomerasa que facilitan la formación adecuada de los puentes disulfuro. Las enzimas que catalizan la isomerización *cis-trans* de la prolina en muchas ocasiones chaperonas (Grp78/BiP, Grp94, y Grp170) se encuentran presentes también el lumen del RE (100).

Otra de las razones por las cuales *P. pastoris* es reconocida como un modelo eficiente en la glicosilación, expresión y secreción de proteínas recombinantes humanas es porque es capaz de realizar O-glicosilación y N-glicosilación de sus carbohidratos para secretar proteínas. Sin embargo, en los estudios realizados por Lin *et al.* (66), se demostró como la diferencia en el número de unidades de azúcares agregadas en humanos comparada con *P. pastoris* se convierte en un problema visto desde el punto de la secreción de glicoproteínas de uso terapéutico. Las proteínas secretadas por la levadura suelen ser extremadamente antigénicas cuando son introducidas al torrente sanguíneo de donde son eliminadas fácilmente (66).

De acuerdo a los estudios realizados por *Sáenz y col. y Peña col.*, menos del 1% del total de las proteínas tiene predicción terciaria determinada experimentalmente y sólo el 20% de las proteínas se reportan como producto de la predicción computacional por homología donde sólo se tiene conocimiento del 10% de las proteínas totales debido a los altos costos experimentales (80, 92). De esta manera, la predicción por modelación homóloga computacional permite tener una aproximación real de la estructura tridimensional de la proteína para ser empleada experimentalmente. Aunque los primeros pasos de este proceso requiere predicciones matemáticas para minimizar niveles de energía y garantizar la estabilidad de la molécula los pasos siguientes se basa en la destreza del investigador para realizar comparaciones teóricas y computacionales, sabiendo que las proteínas homólogas han evolucionado de un ancestro común, que conservan su función a través de la escala biológica y que por lo tanto adoptan estructuras tridimensionales similares (80, 92).

Los altos porcentajes de accesibilidad en la proteína son acordes con los resultados obtenidos con el alto porcentaje de enrollamientos al azar en la estructura terciaria, la alta flexibilidad de la molécula explica porque es una enzima y requiere de esta propiedad para cumplir su función y el bajo perfil de hidrofobicidad en gran parte de la molécula está acorde con la mayoría de zonas expuestas en la estructura terciaria y su naturaleza de enzima lisosomal, en constante interacción con fases polares (80, 92).

Con respecto a las glicosilaciones, se sabe que las proteínas por ser de naturaleza lisosomales tienden a sufrir modificaciones postraduccionales entre las cuales la glicosilación es de gran importancia. Los sitios potenciales de N-glicosilación presentan probabilidad de glicosilarse que oscilan entre 60 y 80%, pero los sitios potenciales de O-glicosilación no tienen probabilidades superiores al 50% por lo

cual no se consideran como potencial sitio de glicosilación. El modelo de estructura terciaria permitió observar los sitios potenciales de glicosilación debido a que se encuentran expuestos lo que facilita su ocupación por glicósidos y donde además, se puede evidenciar la entrada al bolsillo que contiene el sitio activo propuesto (80, 92).

En cuanto al análisis de las mutaciones puntuales se sabe que los residuos que se encuentran dentro de una región en un radio de 10Å se consideran como cercanos al sitio activo y por consiguiente los demás se consideran lejanos (80, 92). De acuerdo a la agrupación de los aminoácidos: hidrofóbicos (G, A, V, L, I, M, P, F, W), polares neutros (S, T, N, Q, Y, C) y polares cargados (K, R, D, H, E) se puede establecer que las interacciones locales por cambios electrostáticos y de estructura generados por los cambios de residuos cargados o aromáticos generalmente resultan en variaciones drásticas en la estructura de la proteína mutada, causando que la misma pierda o vea disminuida su capacidad catalítica, lo que explica fenotipos severos. La distancia de la Cisteína 84, como referencia del centro activo puede aminorar los cambios locales de tal manera que el efecto sobre la funcionalidad de la enzima se afecte en forma mínima (80, 92).

De esta forma podría existir una relación genotipo-fenotipo si se sabe que las mutaciones en la región cercana al sitio activo, se consideran de gravedad severa de la enfermedad; sin embargo, e independiente de este aspecto, se sabe que se presentan fenotipos graves cuando hay mutaciones por tirosina o prolina o cuando ocurre un cambio por un aminoácido polar cargado, pero si es mutada en Y por un residuo polar neutro el fenotipo es moderado, así como si muta R o si mutan aminoácidos alifáticos por aspartato o si se cambia un aminoácido hidrofóbico por hidrofóbico o polar neutro por polar neutro (80, 92).

La producción de una proteína de interés con una glicosilación reducida (pocos azúcares) evitando el problema de las cadenas hipermanosiladas de las levaduras metilotróficas, puede ser obtenida por varias vías (52, 102). Entre las posibilidades se puede tener una secuencia de nucleótidos capaz de expresar una glicoproteína puede ser introducida en la célula de una levadura metilotrófica transformada con uno o más vectores o obtener una levadura modificada por medio de ingeniería genética transformada con uno o más vectores o por último que la levadura no exprese la proteína de interés. Las proteínas producidas según el protocolo de *Contreras y col.*, incluyen proteínas humanas como la α -galactosidasa, por lo cual sería posible pensar en la obtención de otras enzimas lisosomales como la IDS y la GALNS. Además, este mismo estudio propone la posibilidad de incluir secuencias adicionales como péptidos señal como el α -MF o la PHO1, el cual permite alcanzar mayores niveles de expresión de la proteína como se muestra en la tabla 2.

Finalmente, respecto a los niveles de expresión, el estudio realizado por *Boettner y Col.*, muestra como 79 proteínas humanas no glicosiladas, de no más de 500 aminoácidos fueron clonadas en un vector de expresión intracelular y expresadas en *P. pastoris* (11). El estudio demostró que cuando los *pI* para proteínas de membrana eran 5-6 o de 8,5-9 para proteínas nucleares, la proteína no se expresaba debido posiblemente, a clusters presentes en estas. Otros criterios como el peso molecular, la hidrofobicidad de la molécula y el porcentaje de residuos cortos cargados negativamente no se relacionados con la expresión de la proteína. Los resultados podrían servir de base para una optimización orientada al conocimiento de secuencias de genes, tanto para aumentar el rendimiento de proteína y para ayudar a orientar selección y el diseño de métodos de expresión de alto rendimiento.

8. CONCLUSIONES

- La evidencia bibliográfica demostró que los mecanismos de glicosilación de las proteínas IDS y GALNS empleados por la levadura *P. pastoris* son altamente conservados y similares a los presentados por organismos eucariotas superiores por lo cual ofrece múltiples ventajas para ser empleada como modelo biológico de expresión de proteínas humanas.
- Se encontró que la N-glicosilación, junto con factores como el peso molecular y el número de copias del mismo gen afectan el nivel de expresión de las proteínas recombinantes expresadas por *P. pastoris*, aunque el efecto de estos factores sea impredecible y varíe para cada una de las proteínas estudiadas. Además, otros factores que afectan la N-glicosilación, como la hidrofobicidad, y la presencia de N-oligosacáridos, son factores que deben controlarse para lograr una expresión adecuada y la secreción de la proteína recombinante.
- Los hallazgos teóricos demuestran que la N-glicosilación llevada a cabo por *P. pastoris*, es un mecanismo más eficiente que la O-glicosilación, pese a que la levadura posee la maquinaria enzimática para llevar cabo los dos procesos.

9. RECOMENDACIONES

La evidencia demostró que el proceso de N-glicosilación es de gran importancia para la producción de IDShr y GALNShr llevado a cabo por la levadura *P. pastoris*, sin embargo, es recomendable evaluar factores en el medio de cultivo de la levadura que permitan optimizar la expresión y la secreción de las proteínas.

Para evaluar el proceso de N-glicosilación, se recomienda adelantar pruebas experimentales que permitan comprobar si existe alguna fracción de la enzima sintetizada que no está siendo secretada de manera óptima.

Finalmente se recomienda centrar la atención en las predicciones de estructuras secundarias y terciarias elaboradas por medio de modelos computacionales, ya que son la herramienta necesaria para la construcción de conocimiento complementario a los diseños experimentales.

10. REFERENCIAS

1. Albano LMJ, Sugayama SSMM, Bertola DR, Andrade CEF, Utagawa CY, Puppi F, Nader HB, Toma L, Coelho J, Leistner S, Burin M, Giugliani R, Kim CA. Clinical and Laboratorial Study of 19 Cases of Mucopolysaccharidoses, *Revista Hospital y Clínica de la Facultad de Medicina de Sao Paulo* 2000; **55** (6): 213-218.
2. Bagshaw R, Zhang S, Hinek A, Skomorowski M, Donald W, Clarke J, Callaham J. Novel mutations (Asn 484 Lys, Thr 500 Ala, Gly 438 Glu) in Morquio B disease, *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; **1588**: 247-253.
3. Ballabio A, Shapiro LJ. STS Deficiency and X-linked Ichthyosis, in Scriver CH, Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, 7, New York, 1995, p. 2999-3022.
4. Bank R, Groener J, Gemund J, Maaswinkel P, Hoeben K, Schut H, Everts V. Deficiency in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase results in collagen perturbations in cartilage of Morquio syndrome A patients, *Genetics and Metabolism* 2009; **97**: 196-201.
5. Barragán CE. *Influencia del α -factor sobre el nivel de expresión de proteínas humanas en Pichia pastoris: Revisión sistemática de literatura*, Tutor (es): Sáenz H, Poutou R, Mercado M. **Tesis de pregrado**. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia., 2005, 102p.
6. Barragán CE, Sáenz H, Poutou RA, Córdoba H, Mercado M, Barrera LA. Influencia del α -factor sobre la expresión de IDS_{hr} en *Pichia pastoris*: Revisión Sistemática de literatura y análisis computacional, *NOVA* 2005; **3** (4): 80-91.
7. Barrera LA. Estudios bioquímicos de los errores innatos del metabolismo en Colombia, durante dos décadas, *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 2009; **XXXIII** (128): 377-394.
8. Barry M, Beardslee M, Braverman A. Morquio's syndrome: severe aortic regurgitation and late pulmonary autograft failure, *Journal Heart Valve Disease* 1997; **15**: 839-842.
9. Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D. Genetics, Biochemistry, and Molecular Basis of Variant Human Phenotypes, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, Inc., New York, 1995, p. 3-128.
10. Bertthauer R, Castellino F. Glycosylation of *Pichia pastoris* - derived proteins, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1999; **30**: 193-200.
11. Boettner M, Steffens C, von Mering C, Bork P, Stahl U, Langa C. Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*—A comparative view on 79 human genes, *Journal of Biotechnology* 2007; **130**: 1-10.

12. Bonuccelli G, Di Natale P, Corsolini F, Villani G, Regis S, Filocamo M. The Effect of Four Mutations on the Expression of Iduronate-2-sulfatase in Mucopolysaccharidosis Type II, *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; **1537**: 233-238.
13. Brady R, Schiffmann R. Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders, *Lancet Neurology* 2004; **3**: 752-756.
14. Brady RO, Pentchev PG, Gal AE, Leahy WR, Quirk JM, Dekaban AS. Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency: Use of Purified Ceramidetrihexosidase in Fabry's Disease., *The New England Journal of Medicine* 1973; **289**: 9-14.
15. Braun S, Aronovick EL, Anderson RA, Crotty PL, McIvor RS, Whitley CB. Metabolic Correction and Cross-Correction of Mucopolysaccharidosis Type II (Hunter Syndrome) by Retroviral-Mediated Gene Transfer and Expression of Human Iduronate-2-Sulfatase, *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 1993; **90**: 11830-11834.
16. Buckholz R, Gleeson A. Yeast systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins, *Biotechnology* 1991; **9**: 1067-1072.
17. Burda P, Aebi M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation, *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; **1426**: 239-257.
18. Byers S, Crawley AC, Brumfield LK, Nuttall JD, Hopwood JJ. Enzyme Replacement Therapy in a Feline Model of MPS VI: Modification of Enzyme Structure and Dose Frequency, *Pediatric Research* 2000; **47** (6): 743-749.
19. Cabrera Y, Martínez D, Pérez ER, Márquez GJ, Feble ML. Osmoregulated TAQ Polymerase Gene Expression in *Escherichia coli*, *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2002; **44** (1): 14-18.
20. Castillo M, Pérez P, Fernández R, Valdés R, Nelson E, Sánchez J, Texidor L, Rivera J, Sánchez J, de la Torre Y, Martínez C, Quintana A, Pérez M, Beldarraín A. Kinetic of expression study of the Hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*, *BioProcessing Journal* 2009/2010; **8** (4): 16-23.
21. Cereghino GPL, Cregg JM. Applications of yeast in biotechnology: Protein production and genetic analysis, *Current Opinion in Biotechnology* 1999; **10**: 422-427.
22. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiology Reviews* 2000; **24**: 45-66.
23. Coman DJ, Hayes IM, Collins V, Sahhar M, Wraith JE, Delatycki MB. Enzyme Replacement Therapy for Mucopolysaccharidoses: Opinions of Patients and Families, *Journal of Pediatric* 2008; **152**: 723-727.
24. Córdoba-Ruiz HA, Poutou-Piñales RA, Echeverri-Peña OY, Algecira-Enciso NA, Landázuri P, Sáenz H, Barrera-Avellaneda LA. Laboratory scale

- production of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from *Pichia pastoris*, *African Journal of Biotechnology* 2009; **8** (9): 1786-1792.
25. Córdoba H. *Estudio de la Producción a Nivel de Laboratorio de la Enzima Iduronato 2-Sulfato Humana recombinante (IDS_{hr}) en Pichia pastoris.*, Tutor (es): **Tesis de Maestría**. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., 2004, 110p.
 26. Córdoba H, Algecira N, Poutou RA, Barrera LA. *Pichia pastoris* una Alternativa para la Producción de Glicoproteínas Humanas de Uso Terapéutico. Estrategias de Fermentación, *Revista Colombiana de Biotecnología* 2003; **5** (2): 73-84.
 27. Cosma MP, Pepe S, Annunziata I, Newbold RF, Grompe M, Parenti G, Ballabio A. The Multiple Sulfatase Deficiency Gene Encodes an Essential and Limiting Factor for the Activity of Sulfatases, *Cell* 2003; **113**: 445-456.
 28. Cudry S, Froissart R, Bouton O, Maire I, Bozon D. The 2.1-, 5.4 and 5.7kb Transcripts of The IDS Gene are Generated by Different Polyadenylation Signals., *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; **1447**: 35-42.
 29. Chalès G, Guggenbuhl P. Mucopolysaccharidoses et oligosaccharidoses, *EMC-Rhumatologie Orthopédie* 2004; **1**: 395-405.
 30. Dahms NM, Lobels P, Kornfeld S. Mannose-6-Phosphate Receptors and Lysosomal Enzyme Targeting, *The Journal of Biological Chemistry* 1989; **264**: 12115-12118.
 31. Dangel JH. Cardiovascular Changes in Children with Mucopolissacharide Storage Diseases and Related Disorders - Clinical and Echocardiographic Findings in 64 Patients, *European Journal of Pediatrics* 1998; **157**: 534-538.
 32. Daniele A, Tomanin R, Villani GRD, Zacchello F, Scarpa M, Di Natale P. Uptake of Recombinant Iduronate-2-sulfatase into Neuronal and Glial Cells in vitro, *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; **1588**: 203- 209.
 33. Desnick RJ. Enzyme Replacement and Enhancement Therapies for Lysosomal Diseases, *Journal of Inherited and Metabolic Disease* 2004; **27**: 385-410.
 34. Dierks T, Schlotawa L, Frese M, Radhakrishnan K, Figura K, Schmidt B. Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease - Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins, *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; **1793**: 710-725.
 35. Eklund EA, Freeze HH. Essentials of Glycosylation, *Seminars in Pediatric Neurology* 2005; **12** (3): 134-143.
 36. Eklund EA, Freeze HH. Essentials of Glycosylation, *Seminars in Pediatric Neurology* 2005: 134-143.
 37. Friso A, Tomanin R, Zanetti A, Mennuni C, Calvaruso F, La Monica N, Marin O, Zacchello F, Scarpa M. Gene therapy of Hunter syndrome: Evaluation of the efficiency of muscle electro gene transfer for the

- production and release of recombinant iduronate-2-sulfatase (IDS), *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; **1782**: 574-580.
38. Gahmberh CG, Tolvanen M. Why mammalian cell surface proteins are glycoprotein, *TIBS* 1996; **21**: 308-311.
 39. Gallegos MP, Machorro MV, Flores SE, Zúñiga GM, Figuera LE, González A, Sánchez J. Urinary Glycosaminoglycan Excretion in Healthy Subjects and in Patients with Mucopolysaccharidoses, *Archives of Medical Research* 2000; **31**: 505-510.
 40. Gellisen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts, *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000; **54**: 741-750.
 41. Gemmill TR, Trimble RB. Overview of N- and O-Linked Oligosaccharide Structure Found in Various Yeast Species, *Biochim. Biophys. Acta* 1999; **1426**: 227-237.
 42. Georgiou G, Valax P. Expression of Correctly Folded Proteins in *E. coli.*, *Current Opinion in Biotechnology* 1996; **7**: 190-197.
 43. Grabosky GA, Barton NW, Pastores G, Dambrosia JM, Banerjee TK, Makee MA, Parker C, Schiffmann R, Hill SC, Brady O. Enzyme Therapy in Type I Gaucher's Disease: Enzyme Replacement Therapy in Gaucher's Disease Comparative Efficacy of Mannose-Terminated Glucocerebrosidase from Natural and Recombinant Sources., *Annals of Internal Medicine* 1995; **22**: 33-39.
 44. Gutiérrez MA, García-Vallejo F, Tomatsu S, Cerón F, Alméciga-Díaz CJ, Domínguez MC, Barrera LA. Construcción de un vector de expresión derivado de virus adenoasociados para corregir in vitro el defecto genético de la enfermedad de Morquio A, *Biomédica* 2008; **28**: 448-459.
 45. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans, *Science* 2001; **291**: 2364-2369.
 46. Hersovics A. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosíntesis, *Biochims Byophys Acta* 1999; **1473**: 96-107.
 47. Hersovics A, Orlean P. Glicoprotein Biosynthesis in Yeast, *FASEB Journal* 1993; **7**: 540-550.
 48. Hong Y, Yu SS, Kim J-M, Lee K, Na YS, Whitley CB, Sugimoto Y, Kim S. Construction of a High Efficiency Retroviral Vector for Gene Therapy of Hunter Syndrome, *The Journal of Gene Medicine* 2002.
 49. Imperiali B, O'connor S. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure, *Current opinion Chemical Biology* 1999; **3**: 643-649.
 50. Ioannou YA. Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders with Neuropathology, *Journal of American Society of Nephrology* 2000; **11**: 1542-1547.
 51. Iwamoto M, Nawa Y, Maumenee I, Young-Ramsaran J, Matalon R, Green W. Ocular histopathology and ultrastructure of Morquio syndrome

- (systemic mucopolysaccharidosis IV A), *Graefes Archive Clinical Ophthalmology* 1990; **228**: 342-349.
52. Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, Contreras R, Callewaert N. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology, *Nature Protocols* 2009; **4** (1): 58-70.
 53. Karsten SL, Lagerstedt K, Carlberg B-M, Kleijer WJ, Zaremba J, Van Diggelen OP, Czartoryska B, Pettersson U, Bondeson M-L. Two Distinct Deletions in the IDS Gene and the Gene W: A Novel Type of Mutation Associated with the Hunter Syndrome, *Genomics* 1997; **43**: 123-129.
 54. Kato Z, Fukuda S, Tomatsu S, Vega H, Yasunaga T, Yamagishi A, Yamada N, Valencia A, Barrera LA, Sukegawa K, Orii T, Kondo N. A Novel Common Missense Mutation G301C in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate Sulfatase Gene in Mucopolysaccharidosis IVA, *Human Genetic* 1997; **101**: 97-101.
 55. Kelemen G. Morquio's disease and the hearing organ., *Journal Otorhinolaryngol* 1997; **39**: 233-240.
 56. Kettlesa D, Sheppard M, Liebmann R, Davidson C. Left ventricular Aneurysm, Aortic Valve Disease and Coronary Narrowing in a patient with Hunter's Syndrome, *Cardiovascular Pathology* 2002; **11**: 94-96.
 57. Kjeldsen T, Frost Pettersson A, Hach M. The Role of Leaders in Intracellular Transport and Secretion of the Insulin Precursor in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biotechnology* 1999; **75**: 195-208.
 58. Kozlov DG, Yagudin TA. Antibody fragments may be incorrectly processed in the yeast *Pichia pastoris*, *Biotechnology Letters* 2008; DOI 10.1007/s10529-008-9739-9 (In Press).
 59. Landázuri P. *Clonación Del cDNA de la Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa Humana. Expresión de la Enzima en Escherichia coli y Pichia pastoris*, Tutor (es): **Tesis Doctoral**. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2002, 134p.
 60. Landázuri P, Poutou-Piñales RA, Acero-Godoy J, Córdoba-Ruiz HA, Echeverri-Peña OY, Sáenz H, Delgado-Boada JM, Barrera-Avellaneda LA. Cloning and shake flask expression of hrIDS-Like in *Pichia pastoris*, *African Journal of Biotechnology* 2009; **8** (12): 2871-2877.
 61. Laradi S, Tukel T, Khediri S, Shabbeer J, Erazo M, Chkioua L, Chaabouni M, Ferchichi S, Miled A, Desnick RJ. Mucopolysaccharidosis type IV: N-Acetylgalactosamine-6-sulfatase mutations in Tunisian patients, *Molecular Genetics and Metabolism* 2006; **87**: 213-218.
 62. LeBowitz JH, Grubb JH, Maga JA, Schmiel DH, Vogler C, Sly WS. Glycosylation-Independent Targeting Enhances Enzyme Delivery to Lysosomes and Decreases Storage in Mucopolysaccharidosis Type VII Mice, *PNAS* 2004; **101** (9): 3083-3088.

63. Leighton SEJ, Papsin B, Vellodi A, Dinwiddie R, Lane R. Disordered Breathing During Sleep in Patients with Mucopolysaccharidoses, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2001; **58**: 127-138.
64. Li H, Wang D, Xu A, Li S, Jin S, Wu D. High level expression and purification of active recombinant human interleukin-8 in *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification* 2009; **68**: 60-64.
65. Li Z, Moy A, Sohal K, Dam C, Kuo P, Wittaker J, Wittaker M, Düzgünes N, Konopka K, Franz AH, Lin-Cereghino J, Lin-Cereghino GP. Expression and characterization of recombinant human secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) protein from *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification* 2009; **67**: 175-181.
66. Lin SH, Chou W, Sheu C, Chang M. Improved secretory Production of Glucoamylase in *Pichia pastoris* by combination of genetic manipulation, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; **326**: 817-824.
67. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudiarra P, Baltimore D, Darnell J, *Molecular Biology of the cell*, ed., New York, USA 1999, 1084p.p.
68. Maeda Y, Kinoshita T. Dolichol-phosphate mannose synthase: Structure, function and regulation, *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; **1780**: 861-868.
69. Marquardt T, Denecke J. Congenital disorders of glycosylation: review of their bases, clinical presentations and specific therapies, *European Journal of Pediatrics* 2003; **162**: 359-379.
70. Mashayekhi MR, Zarghami N, Shahbazzadeh D, Rohvand F, Azizi M, Alani B. Subcloning and expression of human alpha-fetoprotein gene in *Pichia pastoris*, *African Journal of Biotechnology* 2006; **5** (4): 321-326.
71. Menéndez C, Zaldívar C, González M. Errores Innatos del Metabolismo. Enfermedades Lisosomales, *Revista Cubana de Pediatría* 2002; **74** (1): 68-76.
72. Millat G, Froissart R, Maire I, Bozon D. Characterization of iduronate sulfate sulfatase mutants affecting N-glycosilations sites and cysteine-84 residue., *Biochemical Journal* 1997; **326** (1): 243-247.
73. Millat G, Froissart R, Maire I, Bozon D. IDS Transfer from overexpressing cell to IDS-deficient., *Experimental Cell Research* 1997; **230** (2): 362-367.
74. Montaña AM, Yamagishi A, Tomatsu S, Fukuda S, Copeland NG, Orii KE, Isogai K, Yamada N, Kato Z-I, Jenkins NA, Gilbert DJ, Sukegawa K, Orii T, Kondo N. The Mouse N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (Galns) gene: cDNA isolation, Genomic Characterization, Chromosomal Assignment and Analysis of the 5P-Lanking Region, *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; **1500**: 323-334.
75. Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. , *The Journal of Pediatrics* 2004; **44** (s27-s34).

76. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW, *Bioquímica de Harper. Manual Moderno.*, ed., Mexico 2001,
77. Olson LJ, Zhang J, Lee YC, Dahms NM, Kim J-JP. Structural Basis for Recognition of Phosphorylated High Mannose Oligosaccharides by the Cation-dependent Mannose 6-Phosphate Receptor, *The Journal of Biological Chemistry* 1999; **274** (42): 29889-29896.
78. Parkinson E, Muller V, Hopwood J, Brooks D. N-Acetylgalactosamine-6-sulfatase protein detection in MPS IVA patient and unaffected control samples, *Clinica Chimica Acta* 2007; **377**: 88-91.
79. Parodi AJ. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation, *Biochemical Journal* 2000; **348**: 1-13.
80. Peña OM, Reyes LA, Barrera LA. Análisis computacional de la N-Acetil-Galactosamina-6-Sulfato Sulfatasa (GALNS) y quince Mutaciones causantes del Síndrome de Morquio-A. , *IV Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo. Argentina* 2003.
81. Poutou-Piñales RA, Córdoba-Ruiz HA, Barrera-Avellaneda LA, Delgado-Boada JM. Carbon source feeding strategies for recombinant protein expression in *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*, *African Journal of Biotechnology* 2010; **9** (15): 2173-2184.
82. Poutou-Piñales RA, Vanegas Niño A, Landázuri P, Sáenz H, Lareo L, Echeverri OY, Barrera Avellaneda LA. Human sulfatase transiently and functionally active expressed in *E. coli* K12, *Electronic Journal of Biotechnology* 2010; **13** (3): article 8.
83. Poutou RA, Córdoba H, Quevedo BE, Landázuri P, Echeverri OY, Sáenz H, Vanegas A, Acero J, González A, Herrera J, Algesira N, Caicedo L, L.A. B. Expresión de iduronato 2-sulfato sulfatasa humana recombinante (IDShr) en *Pichia pastoris*, *Universitas Scientiarum* 2005; **10** (1): 75-96.
84. Prat C, Lemaire O, Bret J, Zabraniecki L, Fournie B. Morquio syndrome: Diagnosis in an adult, *Joint Bone Spine* 2008; **75**: 495-498.
85. Reddy S, Dhmas N. High-Level Expression and Characterization of a Secreted Recombinant Cation-Dependent Mannose 6-Phosphate Receptor in *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification* 2002; **26**: 290-300.
86. Reddy ST, Kumar SN, Hass AL, Dahms NM. Biochemical and functional properties of the full-length cation-dependent mannose 6-phosphate receptor expressed in *Pichia pastoris*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; **309**: 643-651.
87. Roberts DL, Weix DJ, Dahms N, Kim J-JP. Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor, *Cell* 1998; **93**: 639-648.

88. Rodríguez A, Espejo AJ, Hernández A, Velásquez OL, Lizaraso LM, Córdoba HA, Alméciga-Díaz C, Barrera LA, Sanchez O. Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Escherichia coli* BL21, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2010; **37**: 1193–1201.
89. Rodríguez S F, Gómez T A. Mucopolisacaridosis, *Salud UIS* 2003; **35**: 135-144.
90. Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression, *Current Opinion in Biotechnology* 1995; **6**: 527-533.
91. Sáenz H, Barrera LA. La Terapia de Reemplazo Enzimático en el Tratamiento de Enfermedades Genéticas, *Universitas Scientiarum* 2003; **8** (2): 31-42.
92. Sáenz H, Lareo L, Poutou RA, Sosa C, Barrera LA. Predicción Computacional de la Estructura Terciaria de la Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa Humana, *Biomédica* 2007; **27** (1): 7-20.
93. Sagt CMJ, Kleizen B, Verwaal R, de Jong MDM, Muller WH, Smits A, Visser C, Boonstra J, Verkleij AJ, Verrips CT. Introduction of an N-Glycosylation Site Increases Secretion of Heterologous Proteins in Yeast, *Applied and Environmental Microbiology* 2000; **66** (11): 4940-4944.
94. Scorer CA. Rapid Selection Using G1418 of High Copy Number Transformants of *P. pastoris* for High-Level Foreign Gene Expression., *Biotechnology* 1994; **12**: 181-184.
95. Sreekrishna K, Kropp KE. *Pichia pastoris*, in Wolf K, (Eds). *Nonconventional Yeast in Biotechnology. A Handbook*. Springer Verlag, 1, Berlin, 1996, p. 203-253.
96. Suarez F, Zarante I. Aspectos clínicos y manejo integral del síndrome de Morquio, *UNIVERSITAS MÉDICA* 2007; **48** (2): 166-174.
97. Tomatsu S, Montaña AM, Gutierrez M, Grubb JH, Oikawa H, Dung VC, Ohashi A, Nishioka T, Yamada M, Yamada M, Tosaka Y, Trandafirescu GG, Orii T. Characterization and pharmacokinetic study of recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase, *Molecular Genetic and Metabolism* 2007; **91** (1): 69-78.
98. Tomatsu S, Vogler C, Montaña A, Gutierrez M, Dung V, Orii T, Noguchi A, Sly W. Murine model (Galnstm(C76S)slu) of MPS IVA with missense mutation at the active site cysteine conserved among sulfatase proteins, *Molecular Genetics and Metabolism* 2007; **91**: 251-258.
99. Trent G, Trimble R. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species, *Biochim Biophys Acta* 1999; **1426**: 227-237.
100. Trombetta ES, Parodi AJ. Glycoprotein reglucosylation, *Methods* 2005; **35**: 328-337.

101. Vad R, Nafstad E, Dah LA, Gabrielsen O. Engineering of a *Pichia pastoris* Expression System for Secretion of High Amounts of Intact Human Parathyroid Hormone, *Journal of Biotechnology* 2005; **116**: 251-260.
102. Vervecken W, Kaigorodov V, Callewaert N, Geysens S, De Vusser K, Contreras R. In vivo synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*, *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70** (5): 2639-2646.
103. Villani GRD, Daniele A, Balzano N, Di Natale P. Expression of five Iduronate 2-Sulfatase site-directed Mutations, *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; **1501**: 71-80.
104. Waldow A, Schmidt B, Dierks T, Von Bülow R, Von Figura K. Amino Acids Residues Forming the Active Site of Arylsulfatase A., *The Journal of Biological Chemistry* 1999; **274**: 12284-12288.
105. Wells L, Vosseller K, Hart G. Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc, *Science* 2001; **291**: 2376-2377.
106. Wilson PJ, Morris CP, Anson DS, Occhiodoro T, Bielick J, Clements PR, Hopwood JJ. Hunter Syndrome: Isolation of an Iduronate 2-sulfatase cDNA clone and analysis of patients DNA., *Proceedings of National Academy of Science, USA* 1990; **87**: 78531-78535.
107. Wysocka M, Campos JA, Pal A, Findlay JB. Expression and characterization of recombinant human retinol-binding protein in *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification* 2010.
108. Yarema KJ, Bertozzi C. Characterizing glycosilation pathways, *Genome Biology* 2001; **2** (5): review/0004.0001-0004.0010.
109. Yoskovithc A, Tewfik TL, Brouillette RT, Schloss MD, mDer Kaloustian VM. Acute Airway Obstruction in Hunter Syndrome, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 1998; **44**: 273-278.