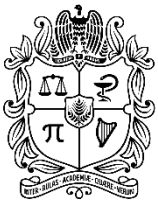


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Identificación de moléculas pequeñas con potencial uso como chaperonas farmacológicas para la enzima humana N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS)

Sergio Olarte Avellaneda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2022

Identificación de moléculas pequeñas con potencial uso como chaperonas farmacológicas para la enzima humana N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS).

Sergio Olarte Avellaneda

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacología

Director:
Carlos Javier Alméciga Díaz, Químico Farmacéutico, PhD Ciencias Biológicas
Codirectora:
Luz Mary Salazar Pulido, Química, PhD Ciencias Química.

Línea de Investigación:
Expresión de proteínas recombinantes como modelos de Terapia de Reemplazo Enzimático

Grupo de Investigación:
Instituto de Errores Innatos del Metabolismo
Facultad de Ciencias - Pontificia Universidad Javeriana

Universidad Nacional de Colombia
Facultad Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2022

Dedicatoria

A Dios,
mi hijo,
mi esposa,
mi mamá,
mis hermanos,
mi familia
y todos lo que han confiado en mí.

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Javier Alméciga, por su orientación, compromiso y dedicación desde el inicio hasta el final de este proyecto de investigación. Así como su amistad y gran ejemplo como investigador.

A la Dra. Luz Mary Salazar por compartir su amplia experiencia y colaborarme con la revisión, guía y preparación para la presentación de este trabajo de maestría.

Al Instituto de Errores Innatos del Metabolismo por permitirme conocer tan excelente grupo de personas e investigadores.

A la Universidad Nacional de Colombia y a la Facultad de Ciencias por la oportunidad académica de realizar y cursar una maestría de tanta alta excelencia académica.

Al Centro de Alto Rendimiento Computacional Javeriano – ZINE, donde se llevaron a cabo las tareas de procesamiento computacional.

A Felipe Rojas por su asesoría con la obtención y evaluación de la estructura de GALNS.

A Oscar Ortega por su revisión y comentarios constructivos para consolidar el documento de tesis final.

A Sindy Bernal y Lorena Rozo por la revisión general del documento.

A los jurados que con sus comentarios y recomendaciones me permitieron consolidar un trabajo de investigación más robusto y detallado.

A mi familia por su apoyo y amor, y a Dios por sus constantes bendiciones.

Resumen

La mucopolisacaridosis IV A (MPS IVA) es una enfermedad autosómica recesiva causada por la deficiencia de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS). La mayoría de mutaciones que afectan a esta enzima son de sentido errado, afectando su plegamiento y tráfico intracelular. En este sentido, se ha propuesto el uso de chaperonas farmacológicas (CFs) como una alternativa de tratamiento. Las CFs tienen la capacidad de mejorar el plegamiento, evitar la degradación y favorecer el tráfico intracelular de la proteína mutada, recuperando su función biológica. Aunque estas moléculas han sido evaluadas en otras enfermedades de depósito lisosomal, su estudio en la MPS IVA se encuentra en etapas iniciales. Con el objetivo de identificar nuevas moléculas que puedan ser empleadas como CFs, en este estudio se realizó inicialmente un análisis computacional de las interacciones de la enzima GALNS humana con sustratos naturales y artificiales. Todos los sustratos naturales se localizaron al fondo de la cavidad activa con el grupo sulfato interactuando con el residuo catalítico (formilglicina, FGly) y cercanos al calcio. Queratán sulfato (QS) fue el sustrato con el valor más bajo de energía de afinidad en comparación con los otros sustratos evaluados. Posteriormente, con base en esta información se realizó un estudio de reutilización de fármacos a través de un tamizaje virtual. Mediante este protocolo fue posible predecir moléculas con la capacidad de interactuar con la cavidad activa de GALNS y con afinidades mayores que las predichas para el sustrato natural QS. Las simulaciones predijeron que estos compuestos interactúan con aminoácidos claves como Leu78, Tyr108, Ile294, Gln311 y Ser521, los cuales participan en la interacción con los sustratos naturales de la enzima. Entre los compuestos identificados se encontraron bromocriptina, devazepida, tadalafilo y telmisartán. Las simulaciones de dinámica molecular sugieren que la posición de los compuestos fue estable durante el tiempo evaluado. En conclusión, la evaluación *in-silico* ha permitido identificar nuevos candidatos, expandiendo el estudio y búsqueda de CFs como una terapia alternativa para la MPS IVA.

Palabras clave: MPS IVA; GALNS; queratán sulfato; chaperonas farmacológicas; acoplamiento molecular computacional, dinámica molecular; tamizaje virtual.

Abstract

Identification of small molecules with potential use as pharmacological chaperones for the human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) enzyme

Mucopolysaccharidosis type IV A (MPS IVA) is an autosomal recessive disorder caused by a deficiency of the lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS). Most of the mutations that affect this enzyme are missense, affecting the folding and intracellular traffic. In this sense, it has been proposed the use of small molecules, called pharmacological chaperones (PCs), as an alternative treatment. PCs have the capacity to promote the correct folding, prevent degradation, and favor the correct intracellular trafficking of the mutated protein, recovering the biological function of the enzyme. Although these molecules have been evaluated in other lysosomal storage disorders, their assessment in MPS IVA is on the early stages. To identify new molecules that can be used as PCs, in this study a computational analysis of the interactions of the human GALNS enzyme with natural and artificial substrates was initially carried out. All-natural substrates were placed at the bottom of the active cavity with the sulfate group interacting with the catalytic residue (formylglycine, FGly) and close to calcium. Keratan sulfate (QS) was the substrate with the lowest value of affinity energy compared to the other evaluated substrates. Subsequently, based on this information, a drug repurposing study was carried out through a virtual screening. Using this protocol, it was possible to predict molecules with the ability to interact with the active cavity of GALNS and with affinities greater than those predicted for the natural substrate QS. The simulations predicted that these compounds interact with key amino acids such as Leu78, Tyr108, Ile294, Gln311 and Ser521, which participate in the interaction with the natural substrates of the enzyme. Bromocriptine, devazepide, tadalafil, and telmisartan were among the identified compounds. Molecular dynamics simulations suggest that the position of the compounds was stable during the evaluated time. In conclusion, *in-silico* assessment may allow the prediction of novel candidates expanding the study and search of PCs as alternative therapy for MPS IVA.

Keywords: MPS IVA; GALNS; keratan sulfate; pharmacological chaperones; computational molecular docking; molecular dynamic; virtual screening.

Contenido

1. Introducción 13

2. Planteamiento del problema 15

3. Justificación 17

4. Objetivos 19

4.1 Objetivo general 19

4.2 Objetivos específicos 19

5. Antecedentes 20

6. Marco teórico 23
6.1 Errores innatos del metabolismo 23
6.2 Enfermedades de depósito lisosomal 23
6.3 Mucopolisacaridosis 24
6.4 Mucopolisacaridosis IV A y GALNS. 25
6.5 Correlación genotipo – fenotipo 29
6.6 Tratamiento de la MPS IVA 32
6.7 Chaperonas farmacológicas 36
6.8 Biología computacional 40

7. Metodología 47
7.1 Preparación de la estructura de la enzima GALNS humana. 47
7.2 Acoplamiento molecular computacional 48
7.3 Tamizaje virtual 49
7.4 Dinámica molecular 51

8. Resultados y análisis 54
8.1 Estructura de GALNS. 54
8.2 Posibles interacciones de GALNS humana con sus sustratos. 58
8.3 Identificación de moléculas pequeñas con potencial para interactuar dentro la cavidad activa de GALNS humana. 70
8.4 Dinámica molecular de GALNS con diversas moléculas pequeñas. 88

9 Conclusiones y recomendaciones 98

10 Bibliografía 100

11 Anexos 116

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1: Estructura terciaria de GALNS modelada usando como base la estructura de la Arilsulfatasa A……26

Figura 2: Principales características clínicas observadas en pacientes con fenotipo clásico de la Mucopolisacaridosis IVA……27

Figura 3: Terapia con chaperonas farmacológicas específicas de sitio activo……37

Figura 4: Acoplamiento molecular computacional……42

Figura 5: Metodología general usada en este trabajo……47

Figura 6: Isómeros geométricos de Val283 en la estructura de la proteína GALNS y comparación por dinámica molecular de los dos estados……55

Figura 7: Acoplamiento molecular con condroitin-6-sulfato, el monómero galactosa-6-sulfato y queratán sulfato……59

Figura 8: Acoplamiento molecular con queratán sulfato……60

Figura 9: Acoplamiento molecular de GALNS con el sustrato artificial……62

Figura 10: Acoplamiento molecular de GALNS con ezetimiba……68

Figura 11: Acoplamiento molecular de GALNS con bromocriptina……77

Figura 12: Acoplamiento molecular de GALNS con tarazepida……80

Figura 13: Acoplamiento molecular de GALNS con tadalafilo ……81

Figura 14: Acoplamiento molecular de GALNS con telmisartán……84

Figura 15: Comparación del acoplamiento entre las diferentes moléculas……86

Figura 16: Gráfica que compara las variaciones de RMSD de la proteína……89

Figura 17: Gráfica que compara las variaciones de RMSD de los ligandos……90

Figura 18: Comparación de los valores estimados de energía de unión……93

Figura 19: Simulación de dinámica molecular evaluando los sustratos naturales, artificial y bromocriptina……96

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Principales chaperonas farmacológicas en enfermedades de depósito lisosomal en estudios clínicos……..……..……..……..……..……..……..…...39

Tabla 2. Resultados de la evaluación de la calidad de la estructuras……..…...56

Tabla 3: Residuos de GALNS que interactúan con los sustratos naturales y artificial por acoplamiento molecular computacional……..……..……..……..…...63

Tabla 4: Consenso de las Interacciones de GALNS con los sustratos naturales y artificial por acoplamiento molecular computacional……..……..……..…..66

Tabla 5. Tipo de fármacos para las 20 primeras moléculas del tamizaje virtual…….....71

Tabla 6: Valores de energía de afinidad, peso molecular y residuos de GALNS que interactúan por acoplamiento molecular computacional……..……78

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
4MUGPS	4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranósido-6-sulfato
BC	Bromocriptina
C6S	Condroitín-6-sulfato
CF	Chaperona farmacológica
EIM	Errores innatos del metabolismo
FGly	Formilglicina
G6S	Galactosa-6-sulfato
GAGs	Glicosaminoglicanos
GALNS	N-acetilgalactosamina-6-sulfato-sulfatasa
QS	Queratán sulfato
MPS	Mucopolisacaridosis
MPS IVA	Mucopolisacaridosis tipo IV A
RE	Retículo endoplasmático
RMSD	Raíz del error cuadrático medio
TRE	Terapia de reemplazo enzimático

1. Introducción

La mucopolisacaridosis IVA (MPS IVA) es un error innato del metabolismo, del grupo de las enfermedades de depósito lisosomal, causada por la deficiencia total o parcial de la actividad de la enzima lisosomal N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS). GALNS es una enzima encargada de remover el grupo sulfato de los residuos de N-acetilgalactosamina-6-sulfato y galactosa-6-sulfato, presentes en los glicosaminoglicanos (GAGs) condroitín-6-sulfato (CGS) y queratán sulfato (QS), respectivamente. En este sentido, esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de GAGs parcialmente degradados en varios tejidos, principalmente en tejido conectivo y cardíaco (1). La heterogeneidad de las mutaciones en el gen *GALNS* genera una amplia variabilidad de manifestaciones clínicas, lo que ha limitado establecer una completa correlación genotipo – fenotipo para la MPS IVA (2), dificultando el diagnóstico y tratamiento de los pacientes afectados por esta patología.

En la actualidad, el tratamiento de pacientes con MPS IVA se realiza mediante terapia de reemplazo enzimático, administrando una versión recombinante de la enzima GALNS humana (elosulfasa alfa) (3). Esta terapia ha mostrado beneficios en algunas de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y en la calidad de vida del paciente. Sin embargo, el impacto limitado en las alteraciones óseas, la generación de una respuesta inmunológica y el alto costo de la terapia han expuesto la importancia de identificar nuevas alternativas de tratamiento (4). Entre estas alternativas se ha planteado el uso de moléculas pequeñas que puedan asistir el plegamiento y tráfico de la proteína mutada. Estas moléculas reciben el nombre de chaperonas farmacológicas (CFs) y podrían ser empleados como monoterapia, o en combinación con otras terapias (5), en el tratamiento de esta enfermedad.

La estructura de GALNS humana fue inicialmente predicha mediante modelación por homología (6) y posteriormente determinada por cristalografía de rayos X (PDB 4FDI) (7).

Tanto el modelo como la estructura han sido útiles en el entendimiento de las bases moleculares de la enfermedad y el desarrollo de estudios enfocados en el diseño racional de fármacos para la terapia con chaperonas farmacológicas (6, 8-10).

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento biológico del mecanismo de acción catalítico de la enzima GALNS humana y la búsqueda de una alternativa terapéutica, en el presente trabajo se realizó un análisis computacional, mediante métodos de acoplamiento y dinámica molecular, del sitio activo de la enzima y su unión con diferentes sustratos; lo que permitió posteriormente la realización de un estudio de reutilización de fármacos por medio de un tamizaje virtual de moléculas pequeñas que interactúen específicamente con la cavidad de GALNS y que puedan tener un potencial uso como chaperonas farmacológicas para la MPS IVA.

2. Planteamiento del problema

La MPS IVA es un desorden de almacenamiento lisosomal generado por la deficiencia total o parcial de la actividad de la enzima lisosomal GALNS, manifestándose clínicamente como una condrodisplasia esquelética sistémica progresiva que afecta notablemente la calidad de vida de los pacientes por las alteraciones en la marcha y respiración (1, 3, 11). Los pacientes pueden presentar un fenotipo desde atenuado a severo, con una amplia heterogeneidad en las mutaciones presentes en la enzima GALNS, lo cual no ha permitido establecer una completa correlación genotipo–fenotipo para esta enfermedad (6, 12).

La terapia de reemplazo enzimático (TRE) con elosulfasa alfa (Vimizim®, BioMarin Pharmaceutical Inc.) constituye el único tratamiento específico para los pacientes con MPS IVA (4). Esta terapia se encuentra aprobada en varios países desde 2014, mostrando impacto positivo en los niveles urinarios de queratán sulfato, la capacidad física y pulmonar y la calidad de vida de los pacientes (3). Sin embargo, esta terapia presenta varias limitaciones como son su pobre efecto a nivel esquelético, en córnea y válvulas cardíacas, la corta vida media de la enzima, complicaciones inmunológicas y su alto costo. En este último aspecto, en el año 2018 el Ministerio de Salud y Protección Social realizó un análisis de los recobros correspondientes al principio activo elosulfasa alfa entre el 2016 y 2017, donde se reportó un gasto total cercano a los 50 mil millones de pesos (13).

Teniendo en cuenta las limitaciones de la actual TRE, se ha planteado la necesidad de mejorar esta terapia o de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Entre las diferentes opciones de tratamiento para la MPS IVA se encuentra el uso de CFs, las cuales son moléculas pequeñas que tras su unión con la proteína favorecen su correcto plegamiento, estabilidad y tráfico intracelular, logrando así recuperar la función biológica de la enzima (14-17). Sin embargo, a diferencia de otras enfermedades de depósito lisosomal (10, 18), el uso de esta estrategia terapéutica para la MPS IVA solo se ha estudiado recientemente (9) y aún es necesario comprender los procesos relacionados con la interacción enzima-

sustrato e identificar nuevas moléculas con el potencial para interactuar como potenciales CFs para la enzima GALNS.

En este sentido, la pregunta problema para este estudio es ¿Cuáles moléculas pequeñas pueden ser identificadas como potenciales chaperonas farmacológicas para la enzima GALNS humana empleando una estrategia de reutilización de fármacos mediante tamizaje computacional?

3. Justificación

En Colombia la ley 1392 del 2010 reconoce a las enfermedades huérfanas como de especial interés, adoptando medidas tendientes a garantizar la protección social por parte del estado a la población afectada por estas enfermedades. Además, plantean como uno de los deberes y obligaciones el estudiar, coordinar y promover el desarrollo de investigaciones, buscando realizar diagnósticos tempranos en pro de una mejor calidad y expectativa de vida, así como, la creación de conciencia y sensibilidad social entorno a estos padecimientos. Estas enfermedades representan un problema de especial interés en salud, debido a su baja prevalencia en la población pero alto costo en atención, requiriendo un mecanismo de aseguramiento especial con un enfoque integral para su abordaje y manejo (19).

La MPS IVA es una enfermedad huérfana dentro del grupo de los errores innatos del metabolismo (EIM), en la que al carecer o existir alteración en la enzima GALNS se da la acumulación de QS y C6S en varios tejidos, alterando la matriz extracelular y generando una condrodisplasia esquelética sistémica degenerativa y de marcado progreso (1, 20). Es considerada como la mucopolisacaridosis con mayor número de pacientes en el país, con 192 pacientes en el registro de enfermedades huérfanas (SIVIGILA - Periodo epidemiológico 2021), así como un número similar identificado mediante tamizaje de alto riesgo (21), ubicando a Colombia como uno de los países con mayor incidencia a nivel global (22-25). Adicionalmente, la identificación de esculturas precolombinas con rasgos sugestivos de pacientes MPS IVA, sugieren la presencia de esta enfermedad en ancestros de esas regiones (Tumaco-La Tolita) (26, 27). Finalmente, una revisión de la literatura realizada sobre enfermedades lisosomales en Colombia, mostró que la MPS IVA es la enfermedad con mayor número de publicaciones y estudios realizados (21).

Con base en la evidencia disponible se resalta la importancia de esta enfermedad para el país desde el punto de vista de salud pública e investigación, destacándose la necesidad de continuar realizando estudios que permitan ampliar el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad y desarrollar alternativas terapéuticas al alcance de todos los pacientes.

En algunos EIM, el tratamiento se basa en cuidados a nivel nutricional y los niños pueden llevar a cabo una vida prácticamente normal. Sin embargo, esto no ocurre en la MPS IVA, la cual no cuenta con un tratamiento costo-efectivo, ya que aunque la TRE mejora la calidad de vida de los pacientes presenta algunas desventajas como su efectividad limitada y alto costo (28). Dadas las limitaciones de la TRE, es importante el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento, siendo el uso de moléculas pequeñas como chaperonas farmacológicas una estrategia que aún no ha sido explorada ampliamente para la MPS IVA, y que presenta un potencial importante dada su posibilidad de administración oral, la ausencia de la respuesta inmunológica y la reducción en los costos de la terapia.

Los análisis computacionales se han convertido en una herramienta útil para el entendimiento de procesos biológicos y en el conocimiento de aspectos relativos a la estructura tridimensional de las proteínas, facilitando el diseño de experimentos de laboratorio y permitiendo el ahorro de tiempo y recursos (29). En este sentido, una evaluación por acoplamiento y dinámica molecular permitiría evaluar la afinidad por moléculas pequeñas que puedan ser altamente afines por el sitio activo, con potencial actividad farmacológica en esta enzima y que permita avanzar en el diseño de una chaperona especifica de GALNS como alternativa de tratamiento para la MPS IVA.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Realizar un análisis de las interacciones de sustratos naturales y moléculas pequeñas para la enzima humana N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS), con el fin de identificar potenciales chaperonas farmacológicas para esta enzima.

4.2 Objetivos específicos

1. Establecer la interacción del sitio activo de la estructura cristalina de GALNS humana con los sustratos naturales y artificiales empleando acoplamiento molecular computacional.
2. Identificar moléculas pequeñas a través de tamizaje virtual, que interactúen con el sitio activo de la enzima GALNS.
3. Evaluar por dinámica molecular computacional la interacción de la enzima con los sustratos naturales, artificial y moléculas pequeñas afines al sitio activo de GALNS humana.

5. Antecedentes

La investigación de la MPS IVA en el país ha estado liderada en gran parte por el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM), quienes han trabajado en el diagnóstico de este síndrome y en estrategias de tratamiento como la TRE y terapia génica (20, 21, 30). El área de expresión de proteínas se ha centrado en la producción y purificación de GALNS recombinante en *Escherichia coli* (31, 32), evaluando las condiciones de cultivo y la presencia del péptido señal sobre la producción (33, 34), así como la obtención de la enzima en *Pichia pastoris* (35). Adicionalmente, se han adelantado importantes estudios sobre el diseño y construcción del vector ideal de terapia génica para que produzca en las células transfectadas un nivel enzimático adecuado GALNS, con su evaluación y comparación como alternativa de terapia génica en la MPS IVA (36-42). Así mismo, se ha realizado la reconstrucción por biología de sistemas de un modelo de alteraciones metabólicas de la vía de degradación de los glicosaminoglicanos (43) y en el uso de biología de sistemas para el estudio de las mucopolisacaridosis (MPS), usando una red de reconstrucción metabólica para comprender el efecto de las alteraciones metabólicas en la homeostasis celular e identificar nuevos biomarcadores potenciales para las MPS (44).

Con respecto a la estructura terciaria de GALNS humana la primera aproximación a su estudio se ha realizado empleando un modelo obtenido por homología con el fin de profundizar en la comprensión de la relación genotipo-fenotipo y en la búsqueda de un nuevo enfoque terapéutico. Se realizó un análisis computacional de la enzima, su sitio activo y las mutaciones que la afectan, donde la combinación de varias herramientas bioinformáticas y el análisis de múltiples parámetros permitieron explicar el fenotipo del 90% de mutaciones de sentido errado y predecir el posible fenotipo clínico para 21 mutaciones sin un fenotipo claro o reportado. Además, este fue el primer estudio en evaluar el acoplamiento molecular computacional de GALNS con sus sustratos naturales y el artificial destacando los aminoácidos claves en la cavidad activa (6).

Posteriormente, la estructura de GALNS humana fue determinada por cristalografía de rayos X a una resolución de 2.2 Å (PDB 4FDI). Empleando esta estructura los investigadores realizaron un análisis estructural de la enzima, su sitio activo, modificaciones post-traduccionales, la unión con su cofactor y con un sustrato natural, compararon la estructura con la de otras sulfatasas, realizaron ensayos de actividad enzimática e inhibición y analizaron el efecto de 120 mutaciones puntuales sobre la estructura de GALNS para revelar las bases moleculares de la MPS IVA y aportar en la correlación genotipo-fenotipo la cual continúa sin estar completamente comprendida (7).

En ese estudio, también se intentó comprender las bases moleculares de la unión del ligando N-acetilgalactosamina con GALNS, pero el sustrato se unió en una orientación no productiva, es decir, no se acopló de manera correcta quedando la cadena de carbono hacia el fondo de la cavidad catalítica en vez del grupo sulfato. Los autores finalizan resaltando que la estructura cristalina reportada sería de gran utilidad en estudios para predecir el efecto de las mutaciones en GALNS y como la mayoría de mutaciones resultan en un plegamiento incorrecto, plantean que será útil en el experimento del diseño racional de fármacos para la terapia con chaperonas farmacológicas o uso de pequeñas moléculas que estabilicen la enzima lisosomal, ya que en ese momento no habían sido investigadas para esta enfermedad huérfana (7).

En el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, empleando el modelo computacional de la enzima GALNS humana se realizó un tamizaje virtual computacional, con lo que fue posible identificar fármacos con afinidades mayores a las predichas para C6S. La evaluación de dos de estos compuestos (ezetimiba y pranlukast) permitió confirmar su interacción directa con la enzima GALNS y mejorar la producción de la enzima recombinante en *P. pastoris* y *E. coli* (9). De forma importante, este mismo efecto no fue observado cuando se incubaron estos compuestos con otra enzima lisosomal como la iduronato-2-sulfatasa, sugiriendo una especificidad de estos compuestos por GALNS. Adicionalmente, se demostró que ezetimiba y pranlukast tienen la capacidad de aumentar la actividad enzimática de la enzima mutada en células de pacientes MPS IVA, así como de disminuir la masa lisosomal tras el tratamiento y posiblemente mejoraría el proceso de autofagia, que es anormal en estas células (9).

De forma similar, empleando el modelo tridimensional de GALNS se simuló la interacción de la proteína con la chaperona farmacológica 2-acetamido-1,2-dideoxy-D-galacto-nojirimycin (DGJNAc), previamente evaluada para la enzima lisosomal α-N-acetilgalactosaminidasa (α-NAGAL) (45), y con un compuesto basado en esta CF pero portando un grupo 6-sulfato (DGJNAc-6Sulfato) (46), se evidenció la importancia de la interacción con los aminoácidos involucrados en la actividad catalítica de la enzima GALNS.

En resumen, los resultados generados han mostrado el potencial de una aproximación computacional para la identificación de fármacos que pueden interactuar con el sitio activo de la enzima GALNS, favoreciendo el correcto plegamiento y la recuperación de su función biológica. De manera importante, esta estrategia puede ser fácilmente adaptable para la identificación de fármacos con capacidad de unión a otras proteínas, como se demostró recientemente para la proteasa principal del virus SARS-CoV-2 (47).

6. Marco teórico

6.1 Errores innatos del metabolismo

En 1908 Sir Archibald Garrod introdujo el concepto de EIM en el Royal College of Physicians (Londres) tomando como ejemplo el albinismo, la alcaptonuria, cistinuria y pentosuria, con lo que sentó las bases para comprender y estudiar este grupo de enfermedades (48-51). Los EIM son un grupo de enfermedades genéticas debidas a la deficiencia de una proteína que llevan a la alteración en el metabolismo de lípidos, carbohidratos, aminoácidos y ácidos nucleicos. Se conocen en la actualidad más de 1500 EIM, los cuales en su gran mayoría presentan un patrón de herencia autosómico recesivo (48, 50).

Los EIM individualmente son enfermedades raras pero en conjunto representan una proporción significativa de la carga de la enfermedad, especialmente en neonatos y niños, aunque los EIM del adulto son cada vez más frecuentes (50). El inicio de la enfermedad puede variar desde las primeras horas de nacimiento hasta enfermedades con inicio en la edad adulta. Dado el amplio grado de heterogeneidad en signos y síntomas, su diagnóstico y manejo representa un reto para los profesionales de la salud (48, 52).

6.2 Enfermedades de depósito lisosomal

Las enfermedades de depósito lisosomal son un grupo de cerca de 70 EIM, producidos por la alteración en algunas de las proteínas involucradas en el correcto funcionamiento del lisosoma. Estas enfermedades se caracterizan por la acumulación intralisosomal de sustratos parcialmente degradados, lo que desencadena el desarrollo de cascadas

patológicas con efectos secundarios como estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático, defectos en la autofagia, alteración en la homeostasis del calcio, inflamación, alteración del tráfico de lípidos y un desbalance significativo de energía en las células afectadas, entre otras (44, 53, 54). Por lo tanto, se ha postulado que el tratamiento para estas enfermedades debe ser combinado, con una terapia que provea una fuente persistente de la enzima recombinante y un tratamiento para las consecuencias secundarias de estas patologías, buscando un efecto sinérgico, ya que la intervención terapéutica de las enfermedades de depósito lisosomal ha sido muy desafiante y compleja (5, 53, 54).

Estas enfermedades son multisistémicas, con manifestaciones clínicas como hepatoesplenomegalia, enfermedad cardíaca, crecimiento anormal de los huesos y defectos inmunes. En aproximadamente el 75% de estos desórdenes hay afectación en el sistema nervioso central (53). Estas enfermedades individualmente son poco frecuentes, pero en conjunto son uno de los grupos de desórdenes genéticos más comunes en niños, afectando aproximadamente 1 de cada 5.000 a 8.000 nacidos vivos, representando una dificultad en términos de salud pública y con un gran impacto económico para el paciente, su familia y el sistema de salud (21, 55).

6.3 Mucopolisacaridosis

Los GAGs son cadenas repetitivas de azúcares modificados y son uno de los principales componentes de la matriz extracelular, encontrándose en una gran variedad de tejidos (56). Estas macromoléculas tienen significancia estructural en la construcción del tejido conectivo y cartílago, además son importantes para la regulación de diversas cascadas biológicas como la coagulación, respuestas inmunes, comunicaciones intercelulares y cicatrización de heridas, interactuando con una amplia variedad de proteínas, incluidos factores de crecimiento y quimiocinas, que regulan procesos fisiológicos importantes (57).

En la degradación de los GAGs están involucradas 11 enzimas diferentes y la pérdida parcial o total de su actividad conllevan a la aparición de un conjunto de enfermedades conocidas como mucopolisacaridosis (MPS); un grupo de enfermedades de depósito

lisosomal en las que los GAGs parcialmente degradados se acumulan en el interior de los lisosomas, como resultado de la alteración en alguna de las enzimas encargadas de su metabolismo. En estos trastornos, dependiendo del defecto enzimático los principales GAGs acumulados son el heparán, dermatán, condroitín y queratán sulfato (52, 58-60).

Las MPS son enfermedades con curso crónico y progresivo, de diferentes grados de severidad, heredadas de forma autosómica recesiva, a excepción de la MPS II que presenta un patrón de herencia ligado al cromosoma X. El análisis de GAGs en orina por medio de pruebas de tamizaje y electroforesis permite orientar el diagnóstico entre varios tipos de MPS, pero para distinguir entre subtipos y confirmar la enfermedad es necesario la determinación de la actividad enzimática y la realización de análisis moleculares (60).

6.4 Mucopolisacaridosis IV A y GALNS.

La Mucopolisacaridosis IV A (MPS IV A, enfermedad de Morquio A, OMIM 253000), fue descrita en 1929 por el pediatra Uruguayo Luis Morquio e independientemente por el radiólogo inglés J.F. Brailsford (1, 51). Para el caso colombiano se han encontrado evidencias en representaciones artísticas de la cultura Colombo – Ecuatoriana, La Tolita, cerámicas con características compatibles con la MPS IVA, mostrando que esta enfermedad estaría en el país desde tiempos precolombinos (26).

La MPS IVA es una enfermedad de herencia autosómica recesiva causada por la deficiencia total o parcial de la actividad de la enzima lisosomal GALNS. El gen que codifica para esta enzima está ubicado en el locus 16q 24.3 y posee 14 exones con un marco abierto de lectura de 1566 nucleótidos (12, 61). GALNS (EC 3.1.6.4) es un homodímero de 120 kDa, es decir, compuesta por dos monómeros de 60 kDa formados por polipéptidos de 40 y 15 kDa unidos por un puente disulfuro y portando dos N-glicosilaciones (62). Esta glicoproteína cataliza la hidrólisis del grupo 6-sulfato presente en la galactosa-6-sulfato (G6S) del QS y en la N-acetilgalactosamina-6-sulfato (NAc-Gal-6S) del C6S.

En la Figura 1 se puede observar la estructura terciaria de GALNS modelada mediante homología (6).

Esta enzima posee un dominio N-terminal, que contiene el sitio activo donde está presente un ion de calcio (Ca^{2+}) como cofactor que estabiliza la formación del éster de sulfato (7). Pertenece a la familia de las sulfatasas humanas, las cuales son un grupo de 17 enzimas que tienen como función catalizar la hidrólisis de ésteres de sulfato presentes en los GAGs, sulfolípidos, glucolípidos, proteoglicanos y esteroides de sulfato, entre otros (63, 64). Para que las sulfatasas lleven a cabo esta función, deben sufrir una modificación post-traduccional realizada por la enzima generadora de formilglicina, codificada por el gen *SUMF1*. Esta enzima convierte una cisteína presente en el sitio activo ubicado en la posición 79 de la secuencia de aminoácidos de GALNS, al residuo no convencional de formilglicina (FGly) (65).

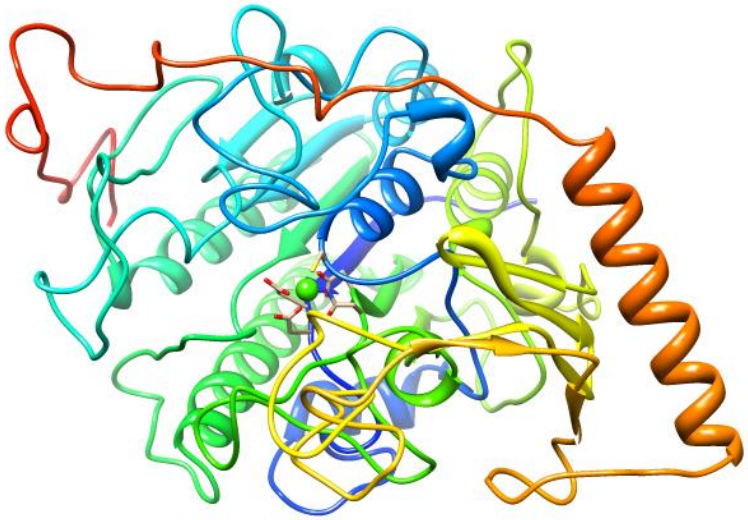


Figura 1: Estructura terciaria de GALNS modelada usando como base la estructura de la enzima Arilsulfatasa A (ASA, PDB 1AUK). La esfera verde representa un ion de Ca^{2+} que actúa como cofactor al fondo de la cavidad catalítica. Tomado de Olarte y Col 2014 (6).

La deficiencia específica de GALNS genera la acumulación en el lisosoma de los GAGs QS y C6S, ocasionando principalmente una condrodisplasia esquelética sistémica. La MPS IVA es una enfermedad con una incidencia global entre 0.09 a 0.14 por 10.000 nacimientos (21, 25). En Colombia, para la región cundiboyacense, se reportó una prevalencia de 0,68 por cada 100,000 habitantes, siendo la MPS con mayor prevalencia entre las identificadas en esta región (24). Estudios recientes han confirmado la alta frecuencia de pacientes con MPS IVA, soportando la idea de que Colombia es uno de los países con mayor incidencia de la enfermedad a nivel global (25). De acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), entre los años 2016 y 2021, 192

pacientes con MPS IVA fueron reportados, convirtiendo esta enfermedad en el segundo EIM con mayor número de pacientes en el país (66).

Es importante resaltar que los pacientes al nacer no presentan ninguna alteración pero aproximadamente a los dos años de edad pueden empezar a desarrollar los primeros síntomas clínicos, que principalmente son problemas esqueléticos como cifoescoliosis, *pectus carinatus, genu valgo, coxa valga*, platispondilia, hipoplasia de odontoides, mielopatía, inestabilidad cervical y alteración de la capacidad para caminar, siendo la joroba en la espalda el síntoma inicial más frecuente (11, 67). El grado de desequilibrio en el crecimiento de los huesos; otros órganos y tejidos contribuyen en gran medida a la displasia esquelética y a la gravedad clínica (68). En la Figura 2, se pueden observar las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad.

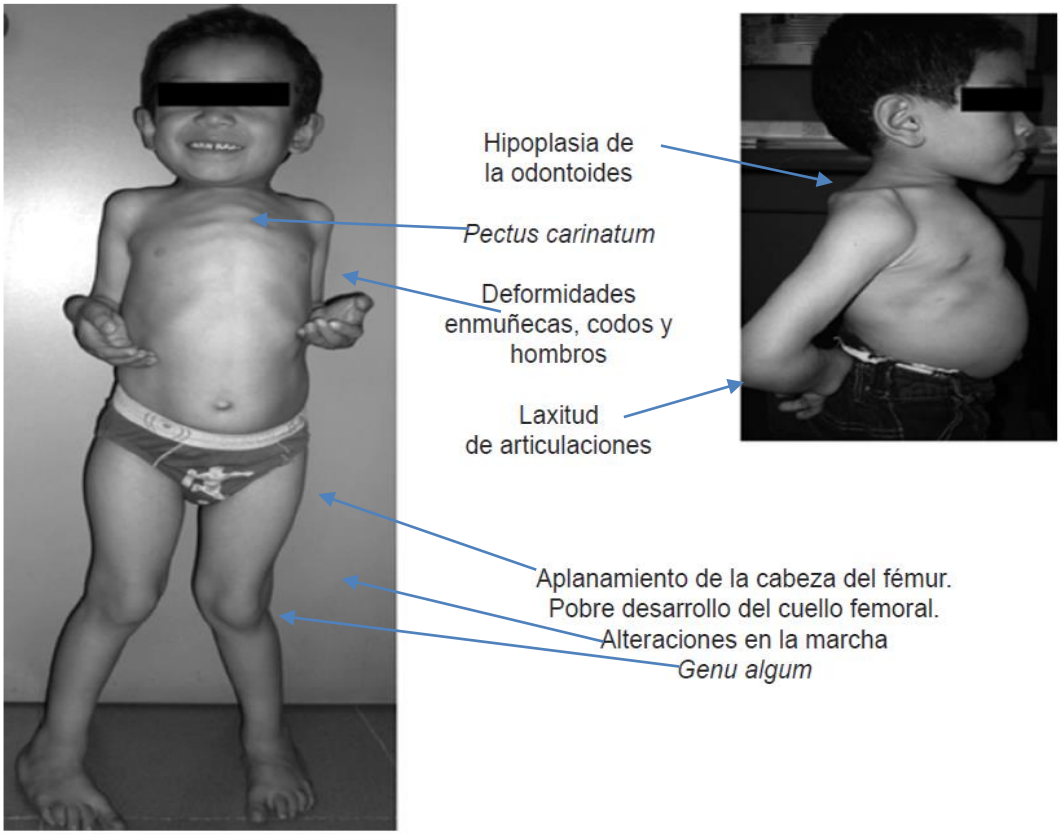


Figura 2: Principales características clínicas observadas en pacientes con fenotipo clásico de la Mucopolisacaridosis IVA. Tomado de Alméciga – Díaz y col 2012 (20).

Adicionalmente, los pacientes presentan baja estatura, facies toscas, complicaciones en la válvula aórtica, compromiso pulmonar, opacidad corneal, fotofobia, pérdida de la audición, apnea del sueño obstructiva, lesiones hepáticas y dientes pequeños, puntiagudos y ampliamente espaciados, con una pequeña cantidad de esmalte, por lo cual con frecuencia sufren de caries. Cabe señalar que no cursan con deterioro del sistema nervioso central, siendo pacientes con una inteligencia normal (1, 69).

Existe una considerable heterogeneidad clínica con un amplio espectro de manifestaciones clínicas para la MPS IVA. Aunque hay características comunes como tronco corto, depósitos corneales y afectación esquelética, cada paciente puede desarrollar ciertas complicaciones, dependiendo de la severidad del fenotipo. La clasificación fenotípica de estos pacientes es subjetiva y se da con base a su estatura y deformidad de los huesos. Normalmente los pacientes con fenotipo severo fallecen entre la segunda y tercera década de la vida principalmente por complicaciones cardiopulmonares (1, 20). En este aspecto, se ha reportado que la edad promedio de muerte es de 25 años; siendo la principal causa en pacientes del Reino Unido la falla respiratoria (63%), seguida de la falla cardíaca e infarto agudo de miocardio (15%) (70).

Recientemente, se ha notificado que los síntomas iniciales y actuales más comunes en el fenotipo severo son *pectus carinatum* y *genu valgo*, mientras que la cifoescoliosis es el hallazgo más frecuente en pacientes con fenotipo intermedio, además hay diferencias en la rapidez de la progresión de los hallazgos clínicos entre fenotipos (71). En comparación con las tablas de crecimiento de referencia, un estudio evaluando 354 pacientes con MPS IVA en 43 países reportó que el patrón de crecimiento se caracteriza por una velocidad de crecimiento alterada después del primer año. A los 4 años, la altura media en pacientes de ambos sexos comienza a disminuir notablemente por debajo del valor sobre dos desviaciones estándar, alcanzando su estatura final aproximadamente a los once años para los hombres y nueve años para las mujeres; así como, en general los pacientes más altos tenían mejor estado físico y de salud que los niños más bajos (72).

Las características clínicas de los pacientes colombianos son similares a las reportadas para otras poblaciones, con baja estatura y alteraciones osteoarticulares y de la marcha (22, 23, 73); mientras el *pectus carinatum* (50%), trastornos en la marcha (40.6%) y baja

estatura (31.2%) fueron los síntomas más comunes al diagnóstico inicial reportados para un grupo de 32 pacientes colombianos con MPS IVA. También se documentó que el 96.8% de los pacientes presentaban un compromiso severo de su enfermedad y que la variante patológica p.G301C estuvo presente en el 51,6% de los alelos mutantes, sugiriendo el efecto fundador de esta mutación en Colombia (22).

Estudios adicionales muestran que estos pacientes tienen una altura promedio de 97 cm (92–104 cm), así como, un promedio de peso y de índice de masa corporal de 26 kg y 27.6 kg/m^2, respectivamente (23). Un estudio de calidad de vida en 28 pacientes colombianos con MPS IVA (edad entre 3.5-27.3 años), mostró que el 68% podría desarrollar actividades de autocuidado sin ninguna dificultad, mientras el 14% no fue capaz de hacer eso. De manera similar, el 53% podría realizar actividades de movilidad sin ninguna dificultad, en cambio el 29% no pudo hacerlo. Sin embargo, el 43% de los pacientes requirió asistencia del cuidador para realizar estas actividades (74).

6.5 Correlación genotipo – fenotipo

Desde los años setenta se postuló que había una relación directa entre ciertos tipos de mutaciones y la severidad de la enfermedad en los EIM. Esta correlación es importante para poder predecir la severidad clínica, realizar un diagnóstico temprano y elegir el tratamiento más adecuado (51, 75).

Para un manejo armónico de estos pacientes es necesario de un diagnóstico prematuro, como el obtenido usando el tamizaje neonatal y el afianzamiento de un tratamiento efectivo, que se inicie en la primera etapa de la vida antes de la aparición de las complicaciones, para lo cual se necesitan estudios que permitan establecer una correlación genotipo - fenotipo para la MPS IVA. Se han descrito cerca de 446 mutaciones en el gen de GALNS, siendo las mutaciones de sentido errado las más comunes (65%) con cerca de 290 mutaciones (76). Para el caso de Colombia, catorce mutaciones han sido descritas; p.G301C, p.R386C y p.S162F son las mutaciones puntuales más frecuentes, estando presentes en cerca del 51%, 16% y 13% de los alelos, respectivamente (21, 77).

Los resultados obtenidos por Tomatsu y Col. (12), sugieren una marcada heterogeneidad molecular de las mutaciones de *GALNS* reflejando la diversidad de fenotipos clínicos en esta enfermedad. Los autores plantean que la falta de una correlación para algunas mutaciones puede ser explicada por su efecto sobre la estructura terciaria y que el análisis para la correlación genotipo – fenotipo será una de las tareas más difíciles para los investigadores dedicados a la MPS IVA.

Se han descrito tres razones para un fenotipo severo: 1) destrucción del núcleo hidrofóbico o modificación de su estructura, 2) pérdida de puentes salinos que desestabilizan la estructura proteica y 3) modificación del sitio activo. Por otro lado, las mutaciones para fenotipo atenuado se han asociado a aminoácidos cercanos a la superficie de la enzima. También se ha planteado que las mutaciones para fenotipo severo se asocian con pérdida de la actividad enzimática residual y las de fenotipo atenuado mantienen una actividad del 1.3 al 13.3% (78).

Sudhakar y Mahalingam (79) modelaron 103 mutaciones puntuales en una estructura predicha de GALNS, evaluando el RMSD (Root Mean Square Deviation), ASA (Solvent-accessible surface area) y afinidad por el sustrato por acoplamiento *In-silico*. Los autores encontraron que las mutaciones de fenotipo severo tienden a presentar cambios drásticos en la estructura dentro de la región hidrofóbica a diferencia de las mutaciones de fenotipo atenuado, con un cambio en el valor de accesibilidad a solvente que afecta sus interacciones moleculares con el sustrato, mientras las mutaciones atenuadas no tienen fuertes fluctuaciones a su exposición a solvente. Aun así, para todas las mutaciones de sentido errado no está disponible una correlación o sigue siendo poco clara y establecerla es esencial para comprender la heterogénea naturaleza de GALNS y además resultará útil para el diseño y consolidación de estrategias terapéuticas (2, 59).

Con el fin de optimizar la correlación genotipo – fenotipo, 124 mutaciones puntuales (sentido errado) fueron analizadas usando un modelo tridimensional de la estructura de GALNS (6). Acoplamiento molecular y análisis de dinámica molecular mostraron que el Ca^{+2}, Cys79, Arg83, His142, y Asp288/Asn289 pueden ser importantes en la interacción con el grupo sulfato de los sustratos naturales; mientras Ala102 y Tyr108 o Tyr181 interactúan con la cadena de carbono, prediciendo la importancia de estos residuos en la

interacción enzima – sustrato. Los análisis por bioinformática predicen que: 1) mutaciones puntuales dentro de la cavidad activa reducen la afinidad GALNS – sustrato, 2) mutaciones severas son asociadas con cambios en residuos altamente conservados en sulfatasas y otras especies, cambios no conservativos y valores bajos de área de superficie atómica accesible, 3) mutaciones atenuadas son asociadas con una conservación intermedia del aminoácido, cambios conservativos en carga del residuo, altos valores de área de superficie atómica accesible y valores de energía de minimización cercanos al de la enzima sin mutaciones (6). Finalmente, un análisis computacional de la cavidad activa de GALNS humana mostró que el 85% de los aminoácidos son altamente conservados entre especies y que la cavidad tiene una carga parcial positiva, lo cual se correlaciona con la carga negativa de los sustratos de GALNS (8).

Así mismo, Kubaski y Col (75) mencionan que a pesar de todos los esfuerzos realizados por caracterizar las mutaciones en GALNS, buscando establecer la correlación genotipo – fenotipo en la MPS IVA, los resultados son todavía decepcionantes. Esta afirmación puede deberse a que varios factores han sido estudiados, tanto desde análisis por bioinformática, ensayos enzimáticos, mediciones de laboratorio y análisis moleculares; pero sigue habiendo mutaciones en las que no se entiende el fenotipo clínico producido debido a la heterogeneidad molecular y al curso progresivo de la enfermedad, por lo cual se ha planteado que futuros modelamientos y estudios deben considerar la normalización de la severidad clínica, es decir, no tener en cuenta los fenotipos reportados previamente ya que este es un parámetro subjetivo (1, 6, 80).

En otro estudio publicado se hizo el análisis de la correlación genotipo, fenotipo y niveles de QS en orina y sangre, los cuales permitieron predecir la severidad clínica de una manera más precisa. Los resultados de este estudio mostraron que: 1) los pacientes con MPS IVA tienen una heterogeneidad clínica y genética extensa, 2) la correlación genotipo-fenotipo fue definida en un 88.5% para las mutaciones identificadas, 3) la severidad clínica se correlaciona con los niveles de QS en plasma y orina, demostrando que pueden ser un biomarcador potencial para el monitoreo del estado y pronóstico de la MPS IVA, y 4) no hubo una fuerte correlación entre los resultados de QS en plasma y orina indicando que el origen del QS en sangre y orina puede ser diferente (67).

El diagnóstico temprano es esencial y realmente importante para evitar serias complicaciones en los pacientes, por ser una enfermedad degenerativa progresiva y para comenzar con el tratamiento de forma oportuna (12, 59). Así mismo, la consolidación del uso de un biomarcador preciso es útil para el seguimiento y monitoreo de la progresión de la enfermedad y efectividad del tratamiento (75, 81).

6.6 Tratamiento de la MPS IVA

Por muchos años el manejo de los pacientes con MPS IVA estuvo dirigido básicamente hacia los cuidados paliativos y el control de cada una de las manifestaciones clínicas, como ocurre en la mayoría de las enfermedades de depósito lisosomal (60, 82). Los pacientes requieren de múltiples cirugías ortopédicas incluyendo descompresión espinal, reemplazo y reconstrucción de cadera a temprana edad y osteotomías por el *genu valgo* (83).

Ha sido reportado que puede haber un alto grado de estrechamiento traqueal, por ejemplo, en la evaluación de 28 pacientes con MPS IVA con imágenes de resonancia magnética sagital, se encontró que el 68% tenía al menos un 25% de estrechamiento traqueal, generando un desafío para el manejo de la vía aérea anestésica. Por eso es importante, mitigar los riesgos en la mala gestión de las vías respiratorias con una adecuada planificación anestésica, que incluya anestesiólogos experimentados y con práctica en el uso de una amplia y completa gama de dispositivos avanzados para vías respiratorias (84). Sin embargo, en los últimos años han venido surgiendo nuevos enfoques como la TRE, en la que se administra de forma exógena la enzima recombinante, así como, el trasplante de médula ósea (85, 86).

Elosulfasa alfa (Vimizim®, BioMarin Pharmaceutical Inc.) es una TRE para la MPS IVA, basada en la administración de la enzima GALNS producida en células de ovario de hámster chino. Elosulfasa alfa finalizó la fase de estudios clínicos en humanos en abril de 2013 y basados en los resultados positivos de un estudio piloto fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de esta mucopolisacaridosis en Febrero de 2014 (87). Para Colombia en marzo de 2016 el INVIMA le concedió el registro sanitario para su comercialización por medio de la resolución Nº. 2016008064.

El estudio fase I/II de etiqueta abierta y escalación de dosis, incluyó 20 pacientes para recibir infusión semanal de la enzima mostrando un cambio significativo en el objetivo de 6MWT (6 min walk test) comparado con placebo (88). Los pacientes que caminaban distancias cortas (≤ 200 m) al inicio del estudio mostraron una mayor mejoría en la distancia al caminar comparado con aquellos que caminaban más de 200 metros previo al inicio del tratamiento de estudio (89). Algunos pacientes continuaron recibiendo infusiones semanales de la enzima (2 mg/kg) por otras 48 semanas (72 semanas en total de tratamiento), pero sin mostrar un beneficio adicional en el objetivo de 6MWT (90). Los resultados de la TRE no afectaron el objetivo evaluado por la prueba de subida de escaleras por 3 minutos (3-minute stair climb test - 3MSCT), mientras que en el test de ejercicio cardiopulmonar (cardio-pulmonary exercise test - CPET) se evidenció un cambio positivo en la capacidad de hacer ejercicio después del tratamiento inicial.

El estudio de fase III (BMN 110) reportó que los niveles de QS en orina disminuían un 40.7% desde el valor basal (89) con la infusión semanal de la TRE y continuaron disminuyendo durante la extensión del estudio clínico hasta las 72 semanas de tratamiento, siendo notable que los cambios en los niveles de QS urinarios no se correlacionaron con los cambios en 6MWT. Un estudio evaluando el tratamiento a 120 semanas incluyó 173 pacientes con MPS IVA y mostró un cambio significativo (media de 59.4%) en la reducción y estabilización de QS urinario, así como, una mejora en los objetivos de 6MWT y 3MSCT para los pacientes que recibieron las infusiones semanales desde el inicio del estudio (89, 90). Recientemente, datos de un estudio de acceso a la terapia (Managed access agreements) en el Reino Unido, confirma el efecto de la elosulfasa alfa en los resultados clínicos y en los reportados por pacientes respecto a los beneficios observados en los ensayos clínicos y proporcionan evidencia real de estabilización a largo plazo, sugiriendo un impacto positivo sobre la historia natural de MPS IVA (91).

La TRE para esta enfermedad es bien tolerada, siendo las reacciones relacionadas a la infusión la reacción adversa más importante, además pueden presentar eventos adversos como vómitos, pirexia y dolor de cabeza, que en general se pueden controlar con tratamiento sintomático y/o modificación de la velocidad de infusión (89). Todos los pacientes que reciben la terapia desarrollan anti-anticuerpos contra la proteína hacia la semana 120 siendo la mayoría derivados de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, los

títulos de anticuerpos no se correlacionan con reducción en la eficacia clínica o aparición de eventos adversos (92).

Es importante mencionar que incluso con la intervención temprana y a largo plazo (antes de los 5 años) de la TRE, las deformidades esqueléticas, compresión espinal cervical, articulaciones hipermóviles y el crecimiento óseo no muestran cambios significativos (93, 94). Hubo poca mejoría en la patología ósea en los restos quirúrgicos de pacientes tratados con TRE, como tambien fue observado en el ensayo preclínico en ratones MPS IVA (28, 86, 95, 96). En general, no hay evidencia suficiente que pueda soportar que la actual TRE proporcione beneficio en el crecimiento óseo, a pesar de la intervención temprana, lo que indica que la TRE no es efectiva para corregir la displasia esquelética en esta enfermedad. Así mismo, la frecuencia y necesidad de cirugía ortopédica no se ha reducido después de recibir la TRE (83). Sin embargo, se deben realizar más estudios en pacientes que comiencen la TRE antes de cumplir el primer año de vida.

La TRE con elosulfasa alfa presenta la desventaja de la aparición de complicaciones inmunológicas, un elevado costo anual, su limitado impacto a nivel óseo, es una terapia de por vida y su administración es semanal (31, 59, 97). Adicionalmente, el National Centre for Pharmacoeconomics de Irlanda consideró no costo-efectivo este tratamiento para el síndrome de Morquio A en pacientes de todas las edades y por lo tanto no recomendó el reembolso del pago del tratamiento por parte del gobierno (http://www.ncpe.ie/wp-content/uploads/2015/05/Web-summary-07-12-2016.pdf).

Para Colombia, la administradora de los recursos del sistema general de seguridad social en salud (ADRES) (13); en una de sus secciones presenta una caracterización de los recobros y establece algunas recomendaciones resumidas a continuación: En los Estados Unidos la enzima usada en la TRE tiene un precio neto de USD 380.000 por año y en Colombia alrededor de 1.200 millones de pesos colombianos al año por paciente, siendo un medicamento de alto costo que tiene un impacto considerable para la sostenibilidad del sistema de salud. Vimizin® no hace parte del aseguramiento colectivo del plan de beneficios de la EPS, por lo que en el caso del régimen contributivo debe ser prescrito en MIPRES, la EPS garantiza el servicio y efectúa el recobro a la ADRES. En el caso del régimen subsidiado, son las EPSs o directamente el departamento o distrito quienes deben

financiar el medicamento. La caracterización del recobro correspondiente a elosulfasa alfa para el 2016 fue de $8.012.026.181 y para 2017 de $49.367.855.575. El valor promedio recobrado por vial para el 2017 fue de 2.917.324 pesos con la identificación de recobros superiores y una desviación alta, que en un caso llegó hasta los 6.208.263 millones de pesos, por lo que la primera recomendación dada, es definir un valor máximo de recobro, que en un escenario de margen del 7% al precio reportado por la industria, llevaría a un ahorro en pesos del 2017 de 2715 millones solo en el régimen contributivo (13).

Adicionalmente, la ADRES también recomendó que al inicio de la TRE es necesario establecer unos logros específicos que se deben alcanzar con la terapia y si al año no se han logrado debe descontinuarse el uso de la enzima recombinante; esto basado en la decisión del comité de expertos de la Agencia Canadiense para los medicamentos. Por último, como parte de lo anterior, se estableció que debería acudirse a una revisión retro y prospectiva de los pacientes que comenzaron tratamiento a más tardar en Marzo de 2017 para evaluar el beneficio clínico después de un año de iniciada la terapia (13).

Por otro lado, el trasplante de médula ósea o con células madre hematopoyéticas no ha mostrado resultados significativos en esta enfermedad, esto puede deberse a su efecto limitado en el tejido cardíaco y sobre las anormalidades óseas en las que no proporciona un efecto inmediato (59, 82). Tomatsu y col, 2015 (86) menciona que el trasplante presenta un mayor riesgo de mortalidad comparado a la TRE y está limitado por edad y estado de salud. Hay un informe de caso detallado de una paciente con MPS IVA con una presentación severa que recibió un trasplante de médula ósea alogénico exitoso a los 15 años y 8 meses de edad, dos años después del trasplante, la actividad enzimática de GALNS en los leucocitos del receptor fue de aproximadamente el 50% de los niveles normales, conservándose durante más de 9 años y reportándose mejoría clínica. Finalmente, concluyen que hay algunas indicaciones en las que el trasplante puede ser una alternativa para tratar esta enfermedad, sin embargo, hasta el momento esta terapia no está recomendada para el manejo de pacientes con este síndrome (98, 99).

La terapia génica se ha postulado como una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad, la cual ha involucrado en estudios preclínicos la evaluación de vectores retrovirales, adenoasociados, y lentivirales; mostrando el efecto de esta terapia en los

niveles de actividad enzimática y reducción de GAGs, así como histopatológicos (42, 100-106). Adicionalmente, se han explorado nuevos sistemas de entrega de la TRE (107) y de expresión para la enzima recombinante (31, 108), así como de una nueva enzima (queratanasa) capaz de degradar el QS, mostrando en ratones MPS IVA que reduce el nivel de QS en sangre y proporciona un impacto positivo en las lesiones de cartílago, convirtiéndose en un nuevo enfoque terapéutico novedoso para esta enfermedad (109).

6.7 Chaperonas farmacológicas

Como consecuencia de que las enfermedades lisosomales presentan fenotipos complejos que hacen desafiante su tratamiento, más la poca eficacia de las terapias actuales, se ha llevado al planteamiento de un nuevo enfoque terapéutico para este grupo de enfermedades. Recientemente, se ha descrito que moléculas pequeñas pueden aumentar la estabilidad de la proteína mutada, al asistir en el plegamiento y tráfico intracelular. Estás moléculas pequeñas reciben el nombre de chaperonas farmacológicas y su uso es una estrategia emergente que también podría ser utilizada en combinación con la TRE para el tratamiento de estas alteraciones metabólicas (10, 16-18).

Algunas mutaciones pueden tener un impacto sobre la conformación de la proteína alterando su plegamiento y podrían exponer un segmento hidrofóbico que normalmente no estaría disponible, resultando en la unión intermolecular con otras proteínas y formando agregados proteicos, con un amplio rango de efectos negativos que han sido asociados con la fisiopatología de varias enfermedades como Alzheimer, Parkinson y Huntington (110). El retículo endoplasmático (RE) tiene un sistema de control de calidad que evalúa el plegamiento de las proteínas sintetizadas y aquellas que están incorrectamente plegadas son etiquetadas para su degradación o en algunas mutaciones que resultan en acumulación de proteína mal plegada, pueden activar la respuesta al estrés en el retículo endoplasmático y muerte celular por apoptosis. En ocasiones las enzimas con mutaciones de sentido errado afectan el plegamiento (estructuralmente inestables), pero no presentan alteración sobre la función y son todavía proteínas catalíticamente activas, pero al ser degradas en el RE no pueden llegar al lisosoma produciendo la acumulación intra-lisosomal de sustratos no degradados (111).

Las CFs son moléculas de bajo peso molecular capaces de asistir a las proteínas para alcanzar su correcta conformación, induciendo estabilización termodinámica y permitiendo que la enzima logre llegar al lisosoma (5, 112, 113) (Figura 3). Teniendo en cuenta que en varias proteinopatías, la restauración de solo el 10 al 20% de la actividad de la proteína es suficiente para prevenir las manifestaciones clínicas de la enfermedad, la terapia basada en las CFs emerge como una alternativa de tratamiento para las enfermedades que resultan del plegamiento incorrecto de proteínas (110).

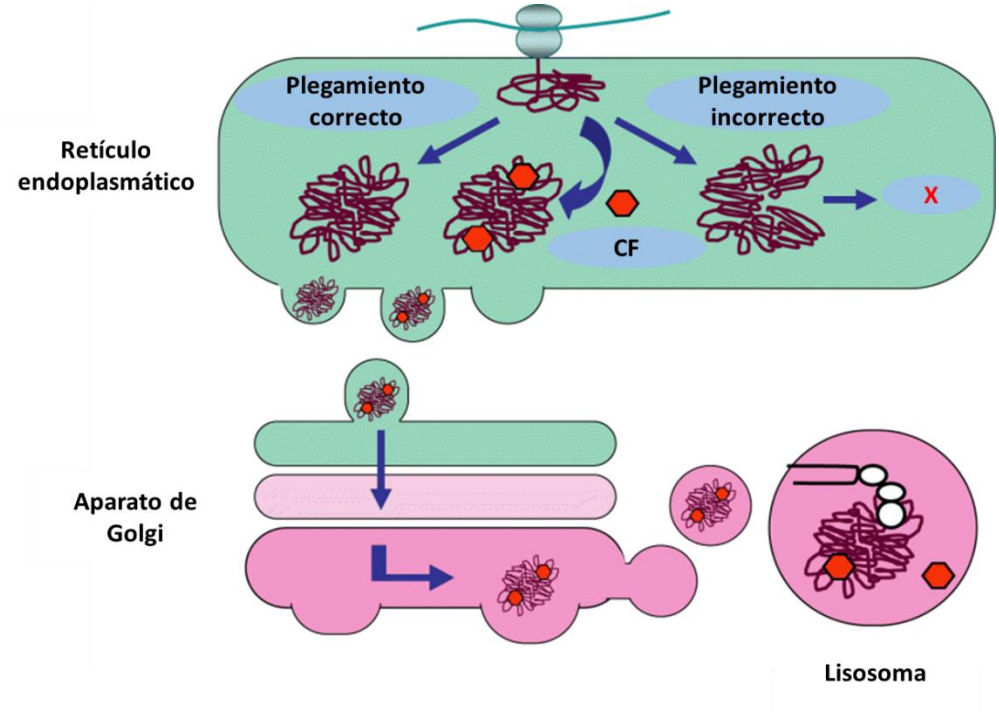


Figura 3: Terapia con chaperonas farmacológicas específicas de sitio activo. La enzima con plegamiento correcto llega al lisosoma, pero la enzima mal plegada es degradada en el retículo endoplasmático, al asistirla con la chaperona farmacológica (CF) logra llegar al lisosoma y ahí es cambiada por el sustrato natural de la enzima lisosomal que se encuentra en exceso. Tomado de Fan 2007 (112) y adaptada al español por el autor de este trabajo.

Hasta el momento las CFs estudiadas interactúan con el sitio activo y actúan como inhibidores reversibles de la enzima. Estos compuestos se unen fuertemente en el pH neutro del RE y posteriormente en el lisosoma a pH ácido son desplazadas por el sustrato natural que se encuentra en exceso (5). Las CFs se unen a las proteínas mediante fuerzas electrostáticas o de Van der Waals o por la formación de puentes de hidrógeno. Como tal no tienen la capacidad de replegar la proteína, pero sí pueden cambiar el equilibrio hacia

el estado de plegado y, por lo tanto, son válidas para mutaciones patogénicas que inducen la desnaturalización de la proteína, estabilizando su estructura. Existen CFs específicas de mutación que no se pueden prescribir a todos los pacientes y aquellas no específicas de mutación. Así mismo, existen las CFs análogas de sustrato que han sido las más estudiadas en las enfermedades de depósito lisosomal (114).

Como lo menciona Parenti y col. (5), las ventajas de esta terapia son una mejor distribución del agente terapéutico, la posibilidad de ser usada en enfermedades neurodegenerativas, administración oral y su pequeño impacto sobre la calidad de vida. Sin embargo, presentan limitaciones como su corta experiencia en el uso clínico, el desconocimiento de eventos adversos a largo plazo y que solo es útil para pacientes con mutaciones sensibles o respondedoras a las chaperonas. Los resultados esperados con el uso de la terapia con CFs, son la estabilidad de la enzima mutada, evitar la degradación y el estrés en el RE, mejorar el tráfico al lisosoma, incrementar la actividad intracelular, la restauración parcial de las funciones metabólicas minimizando las consecuencias tóxicas y el progreso de la enfermedad. Además, se espera que el uso de estas moléculas permita incrementar la estabilidad térmica de las enzimas recombinantes, mejorar su estabilidad conformacional y aumentar su actividad catalítica, lo cual podría potencializar la actual estrategia de TRE (5, 45, 113).

Se han descrito CFs para el tratamiento de enfermedades lisosomales como el migalastat, un análogo de bajo peso molecular similar al sustrato natural de la enzima α-galactosidasa A (deficiente en la enfermedad de Fabry), aprobado por la FDA en 2018 basado en los resultados de estudios de fase avanzada de investigación, los cuales mostraron que reduce la acumulación del sustrato en el tejido renal, la orina y el plasma, manteniendo la función renal en pacientes que presentan mutaciones susceptibles a migalastat (115). A su vez, en el estudio clínico de fase III (ATTRACT) se compararon los resultados de migalastat con los de la TRE para la enfermedad de Fabry, mostrando resultados similares en términos de función renal y en el resto de los parámetros evaluados, además mostró un perfil de seguridad aceptable, siendo bien tolerado y sin efectos adversos clínicamente relevantes en las pruebas de laboratorio de seguridad (116).

Adicionalmente, se han propuesto CFs para las enfermedades de Gaucher tipo I y Pompe, que han sido evaluadas en estudios clínicos (Registrados a 2020) con humanos como es resumido en la tabla 1, así como, para la gangliosidosis GM1, gangliosidosis GM2, mucopolisacaridosis II, IIIC y IVB, enfermedad de Batten y la enfermedad de Schindler/Kanzaki las cuales se encuentran en diferentes fases de investigación, principalmente en la etapa preclínica (5, 45, 112, 113, 117-120).

Tabla 1. Principales chaperonas farmacológicas en enfermedades de depósito lisosomal evaluadas en etapa de estudios clínicos con humanos registrados en ClinicalTrials.gov.

Enfermedad	Molécula pequeña	Estudios clínicos
Gaucher	Tartrato de isofagomina (Afegostat) Ambroxol	**Estudios de fase II**: NCT00433147, NCT00446550, NCT00813865. **Estudio Fase I – II.** NCT01463215 **Estudio Fase II:** NCT03950050***** **Real World Data:** NCT04388969 **Estudio piloto de etiqueta abierta:** (121, 122)
Pompe	AT2221 (Chaperona farmacológica: NB-DNJ).	**Estudio Fase I – II:** NCT02675465 (123) **Fase III:** NCT03729362 (Registro). NCT04138277* **Acceso expandido:** NCT04327973 y NCT03865836 **Población pediátrica:** NCT03911505*
Gangliosidosis GM2 (Tay–Sachs y Sandhoff)	Pirimetamina	**Estudio Fase I-II:** NCT01102686 (124) **Estudio piloto de etiqueta abierta:** (125) - Reporte de caso en un paciente de la India mostrando un efecto transitorio (126).

*Estudios con reclutamiento activo de nuevos pacientes.

Esta estrategia terapéutica no ha sido estudiada ampliamente para las mucopolisacaridosis (10). Específicamente para la MPS IVA, se reportaron recientemente dos moléculas candidatas como chaperonas farmacológicas para esta enfermedad (9). En este sentido, ezetimiba y pranlukast fueron reportadas como las primeras CFs para la MPS IVA, las cuales fueron identificadas mediante acoplamiento molecular y tamizaje virtual empleando una enzima obtenida mediante modelamiento estructural, y que a nivel *in-vitro* permitieron un aumento significativo de la actividad GALNS mutada en fibroblastos de pacientes MPS IVA. Adicionalmente, la combinación de estas moléculas con la enzima

recombinante mostró un efecto aditivo, sugiriendo que el uso combinado de estas dos estrategias terapéuticas podría tener un impacto positivo en el tratamiento de los pacientes con esta enfermedad genética (9).

Uno de los mayores aspectos a investigar en esta área, es en la comprensión de la interacción molecular entre la enzima y la CF, así como, en la identificación de fármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades lisosomales con un buen perfil de seguridad, excelentes propiedades de unión, actividad y distribución intracelular con efecto sobre una amplia variedad de mutaciones (5, 118).

6.8 Biología computacional

La biología computacional es una aplicación tecnológica emergente y en desarrollo rápido y continuo que nace a partir de la necesidad de analizar la información obtenida de proyectos de secuenciación de genomas y la obtención de una gran cantidad de información biológica; así mismo, el estudio de secuencias de nucleótidos o proteínas que se obtienen de bases de datos de acceso público ha permitido el auge de esta área de la ciencia. Así como lo menciona Sáenz y Col. (29) las herramientas de biología computacional son útiles debido a que el conocimiento de aspectos de la estructura y del comportamiento de una molécula facilita el diseño de experimentos y permite el ahorro de energía, tiempo y recursos. Las tendencias actuales en el descubrimiento de fármacos se centran en obtener más información y conocer mejor la causa, mecanismo y caracterización molecular asociada a una determinada enfermedad. Su comprensión, seguida de la identificación de un objetivo terapéutico y el descubrimiento de un compuesto líder (candidato), para su posterior optimización han allanado el camino hacia un descubrimiento de fármacos más eficiente asistido computacionalmente (127).

Las simulaciones computacionales para el descubrimiento y diseño de ligandos basados en la estructura del receptor fueron sugeridas en la década de los años 70s, evolucionando lentamente, pero ganando cada vez más aceptación y utilidad en los últimos años (128). Debido a que la velocidad de las computadoras creció exponencialmente y hubo un aumento en el número de estructuras de receptores disponibles para evaluación, gracias

a los avances de la cristalografía de rayos X y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Por lo que, dependiendo de la calidad de los datos, la alternativa *in-silico* puede ser lo suficientemente confiable para justificar su uso en proyectos de descubrimiento de moléculas activas, lo que proporciona un importante enfoque complementario al tamizaje experimental. Es importante destacar que, aunque esta alternativa puede presentar una alta tasa de falsos positivos, en circunstancias favorables puede predecir nuevos ligandos genuinamente y hacerlo por las razones biológicamente correctas (128, 129).

El tamizaje virtual es una estrategia empleada en el diseño de fármacos basado en estructura (Structure-Based Drug Design), para la búsqueda y evaluación masiva de ligandos disponibles en una biblioteca de compuestos frente a la estructura de una proteína de interés (target) obtenida experimentalmente (disponible en el *Protein Data Ba*nk) o modelada por diferentes métodos computacionales, como el de homología frente a una estructura de referencia o por otros métodos de predicción (threading and ab initio). Por lo tanto, el primer paso consiste en la identificación y validación de una estructura tridimensional, determinando el espacio de unión de interés que puede ser el sitio activo o alguna otra cavidad de la proteína de estudio a ser evaluada por acoplamiento (*docking*) molecular (130).

El acoplamiento molecular computacional es un método teórico para estudiar la interacción y reconocimiento entre proteínas y ligandos, así como podría predecir el modo de unión y la fuerza de afinidad (131). Una de sus aplicaciones es permitir la predicción de posibles interacciones y los aminoácidos involucrados, evidenciándose el sitio activo y la estructura molecular que facilitan la formación de un complejo estable, esto de una manera virtual e hipotética. De forma más sencilla es la representación del modelo de acoplamiento inducido que modificó la teoría de llave – cerradura a un nivel computacional, como se muestra en la Figura 4 (132) en la interacción molecular entre una enzima y su sustrato.

En 1958 se propuso el modelo de ajuste inducido, en el cual se cambió la concepción de estructuras rígidas a uno donde la conformación espacial del sitio activo de la proteína cambia por interacción con el ligando, lo que indica que ambos deben ser considerados como estructuras flexibles durante su acoplamiento. En general, los métodos de acoplamiento molecular se usan para predecir la orientación preferida de una molécula

dentro de una proteína, cuando se unen entre sí para formar un complejo estable. Dependiendo del método usado, existen diferentes consideraciones en la flexibilidad del ligando, de la proteína o de ambos durante el proceso, por lo que se reconocen 3 metodologías: acoplamiento rígido, flexible y semiflexible, en esta última el receptor (proteína) se mantiene rígida y no cambia su conformación, únicamente se permite que el ligando varíe en su posición dentro de un rango establecido (131).

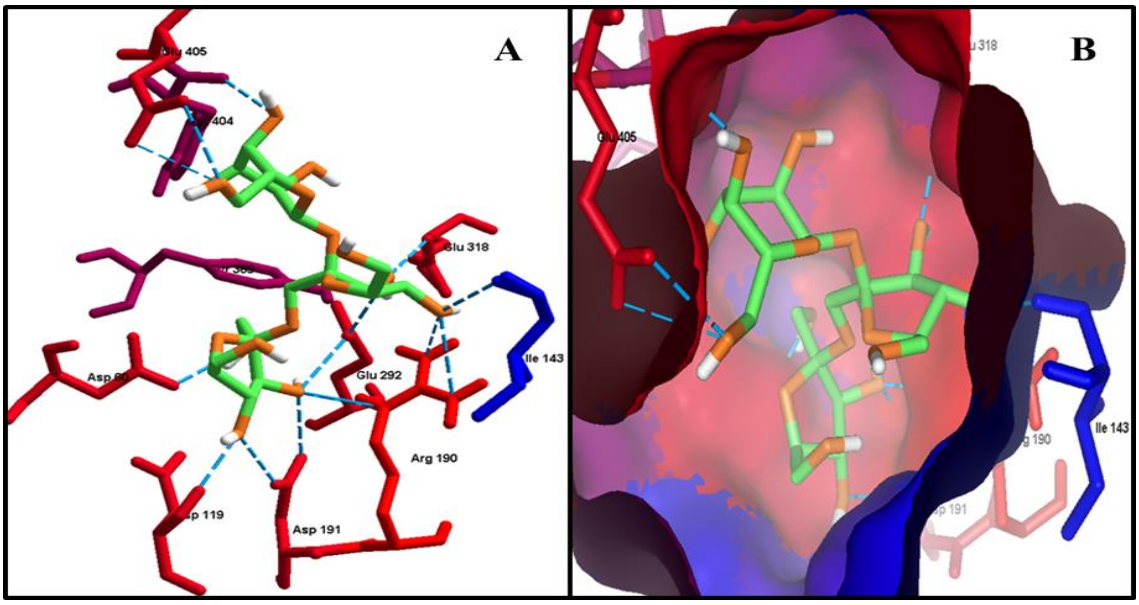


Figura 4: Acoplamiento molecular computacional. **A.** Se observa la interacción del sustrato kestosa con los aminoácidos catalíticos de la fructosiltransferasa de *Aspergillus japonicus*. **B.** Sustrato ubicado dentro del sitio activo. Tomado de Olarte y Col 2012 (132).

El acoplamiento molecular es entonces un enfoque de estudio para modelar la interacción a nivel atómico entre dos o más estructuras moleculares, por ejemplo, una pequeña molécula (sustrato) y una proteína (enzima), lo cual permite caracterizar el comportamiento del ligando en el sitio de unión a la proteína y elucidar procesos bioquímicos fundamentales del complejo formado. Esto involucra dos pasos básicos, uno que determina la orientación o posición del sustrato dentro de la cavidad del sitio activo y el otro que envuelve la energía de afinidad o unión (133).

A su vez, existen diversos paquetes o programas que pueden ser empleados para modelar dichas interacciones, los cuales generalmente se diferencian por el tipo de licencia, si es de libre acceso o comercial, el tipo de modelamiento (proteína – ligando o proteína –

proteína), algoritmo usado para la búsqueda del campo conformacional, el campo de fuerza usado o de acuerdo con la clasificación de las funciones de puntuación (131, 134). Dentro de los programas más reconocidos se encuentran: Gold, AutoDock, DOCK, GLIDE, RosettaDock, pyDOCK (134) y AutoDock Vina (135), entre otros.

AutoDock Vina es un programa de acoplamiento molecular y cribado virtual de libre acceso que utiliza un método de optimización de gradiente sofisticado (sophisticated gradient optimization method) en su procedimiento de optimización local. Mejora la precisión en las predicciones de los modos de unión (conformaciones) y es más rápido en su evaluación logrando una aceleración de hasta dos órdenes de magnitud en comparación con AutoDock4. Tanto AutoDock Vina como AutoDock4 requieren una especificación del "espacio de búsqueda" en el sistema de coordenadas del receptor (proteína), dentro del cual se considerarán varias posiciones del ligando, siendo lo recomendado asegurarse de que el espacio de búsqueda sea lo suficientemente grande para que el ligando pueda rotar dentro de ese espacio (135).

El programa AutoDock Vina utiliza una función de puntuación que tiene en cuenta las contribuciones inter e intramoleculares; se necesita un archivo de entrada para los acoplamientos que es *pdbqt* tanto para el receptor (enzima) como para el ligando (sustrato); en este formato se encuentran las coordenadas 3D de los átomos y los datos de torsión de la estructura. También es necesario un archivo con las especificaciones del tamaño y las coordenadas del espacio de búsqueda. El archivo de salida también se encuentra en formato *pdbqt*; el cual contiene las coordenadas 3D, las torsiones y la información de energía para las mejores conformaciones o modos de unión. Un archivo de texto ordena las conformaciones resultantes por sus puntuaciones de valor de energía de afinidad y los RMSD con respecto a la mejor conformación establecida por el sistema (136).

Por otro lado, están disponibles varias funciones de puntuación (scoring) apoyadas en diferentes algoritmos y conceptos, que se pueden clasificar en empíricos, basados en el conocimiento y basados en el campo de fuerza (empirical, knowledge-based y force field-based), los cuales emplean una serie de funciones matemáticas con diferentes aproximaciones que no necesariamente toman en cuenta algunos elementos termodinámicos de la energía de unión (131, 137).

Es importante resaltar que por su naturaleza biológica las proteínas son macromoléculas dinámicas, por lo tanto, una vista estructural de un complejo enzima-sustrato no es suficiente o no permite elucidar toda la información necesaria para estudiar la interacción de una proteína con una pequeña molécula, o incluso identificar su sitio de unión. El estudio de este comportamiento de las proteínas es llamado simulación por dinámica molecular; basados en la mecánica newtoniana con el uso de campos de fuerza, se puede calcular una trayectoria de conformaciones en función del tiempo. Estas simulaciones, junto con los datos experimentales, tienen un impacto significativo en el campo del descubrimiento de fármacos (127).

Las fuerzas en una simulación de dinámica molecular se calculan utilizando un modelo conocido como campo de fuerza de la mecánica molecular, que se ajusta a los resultados de los cálculos de la mecánica cuántica y, por lo general, se complementa con términos que dependen de los datos experimentales y que dan como resultado una menor energía para las estructuras y que concuerdan mejor con lo obtenido experimentalmente. Las opciones más comunes de campos de fuerza son varias versiones de Amber o CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) y OPLS, que se basan en formas funcionales similares, pero cada uno tiene ciertas fortalezas y debilidades de acuerdo con los sistemas para los cuales se han optimizado y validado (ej. proteínas, lípidos ligandos, etc.). Así mismo, las opciones más comunes de software utilizados incluyen GROMACS, NAMD, AMBER, CHARMM, Desmond y OpenMM, entre otros (138).

GROMACS (GROningen Machine for Chemical Simulations) es un programa libre, versátil y rápido para simulaciones de dinámica molecular. Está diseñado principalmente para moléculas orgánicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que tienen muchas interacciones complejas y muchos grupos funcionales, también es utilizado para investigar sistemas no biológicos. Además, admite todos los algoritmos habituales que se esperan en una implementación de dinámica molecular moderna (139).

El programa GROMACS necesita compilar tres archivos de entrada: uno que contiene la configuración inicial del sistema como las coordenadas (archivo .gro). El que contiene la topología de las moléculas (.top) y define los parámetros del campo de fuerzas del sistema, ya sea directamente o mediante la inclusión de otro formato (archivo. itp) y por último otro

con los parámetros de control que determinan la forma en que se lleva a cabo la simulación, la calidad y el tiempo de cómputo de los resultados obtenidos en la simulación, así como, el número de pasos, controles de salida y el tipo de interacciones, entre otros (archivo .mdp). Al recopilar la información de estos archivos, se genera un archivo ejecutable en binario que contiene toda la información del sistema (archivo .tpr) que es el archivo de salida necesario para correr y calcular toda la dinámica del sistema (140).

A nivel cuantitativo, los métodos basados en simulación pueden proporcionar estimaciones sustancialmente más precisas de las afinidades de unión al ligando (energías libres) que otros enfoques computacionales como el acoplamiento molecular, dado que generalmente ofrecen estimaciones más precisas de las energías de enlace. De manera cualitativa pueden proporcionar información para probar y refinar las posibles posiciones de un ligando, guiar el proceso de optimización; identificar interacciones clave que un ligando hace con la cavidad de unión y predecir reordenamientos inducidos por un ligando sobre la proteína (138).

El reposicionamiento de fármacos realizado desde una evaluación computacional es un enfoque promisorio que puede facilitar, potencializar y agilizar el desarrollo de medicamentos para enfermedades raras o de baja prevalencia donde la investigación es reducida en comparación con enfermedades más comunes; se tiene menor interés para la búsqueda de nuevos fármacos, así como, hay pocos pacientes disponibles y están geográficamente dispersos; lo que dificulta la realización de estudios clínicos. Está estrategia de reposicionamiento ayuda a encontrar nuevos usos a medicamentos existentes siendo una alternativa aplicada a identificar fármacos con información preliminar que ayude a disminuir los tiempos de desarrollo. Es necesario señalar que ningún reposicionamiento computacional de fármacos podría traer resultados exitosos todas las veces y el desafío está en la verificación y comprobación experimental de los candidatos obtenidos a nivel *in silico* (141).

En los últimos años, la evaluación de bibliotecas químicas frente a un objetivo biológico ha demostrado confiabilidad en el diseño de fármacos basados en la estructura siendo ampliamente aplicado en la etapa temprana de la búsqueda de nuevos fármacos, por

ejemplo, para muchos inhibidores de proteínas del virus de inmunodeficiencia humana VIH y para el desarrollo de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (129, 142, 143).

Por último, como lo describe Ho (118), el acoplamiento molecular es un aspecto importante en el descubrimiento y desarrollo de fármacos, en el que ellos lo utilizan para evaluar la interacción y afinidad de una chaperona farmacológica con la enzima lisosomal α-glucosidasa nativa y con mutaciones para la enfermedad de Pompe, demostrando que los estudios computacionales han sido usados en la evaluación de otras enzimas lisosomales.

La terapia con CFs ha sido propuesta como una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades genéticas, por el potencial uso de moléculas pequeñas que puedan administrarse vía oral llegando a tejidos de difícil acceso como es el cerebro y presentar un costo más bajo de producción y comercialización. Para que el desarrollo de estos fármacos sea más rápido de lo normal, podría ser importante explotar la estrategia de reposicionamiento de fármacos, es decir, evaluar medicamentos con un perfil de eficacia y seguridad conocido que puedan tener una acción farmacológica que potencialice la actividad de la enzima de interés. Por ejemplo, por este método se ha reportado el uso del agente mucolítico ambroxol para el tratamiento de las enfermedades hereditarias de Gaucher y Fabry. Por lo tanto, esta estrategia debería ejecutarse automáticamente para el descubrimiento de CFs para otras enfermedades de depósito lisosomal y MPS (144).

7. Metodología

Para desarrollar este trabajo se tuvo en cuenta la metodología seguida y la experiencia obtenida con la realización de los trabajos previos del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (6, 9, 46, 145, 146), en los que se han modelado la estructura de enzimas, evaluado su interacción con sustratos artificiales o naturales y se ha realizado la predicción de compuestos que pueden interactuar con la proteína mediante tamizaje virtual. La Figura 5 resume la aproximación general a la metodología empleada en este estudio y las evaluaciones computacionales que fueron usadas para la obtención y análisis de las moléculas de interés.

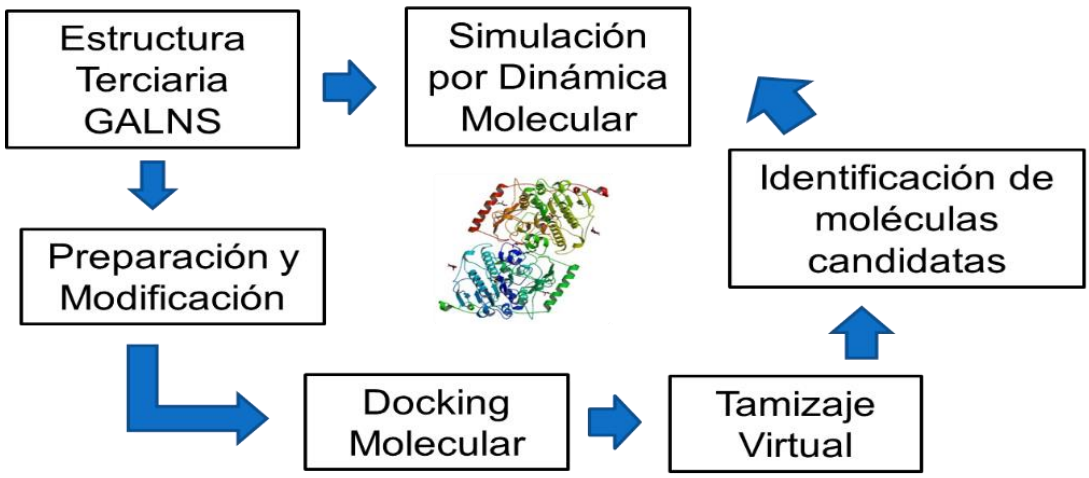


Figura 5: Metodología general describiendo los pasos secuenciales para obtener los resultados de este estudio.

7.1 Preparación de la estructura de la enzima GALNS humana.

La estructura de la enzima GALNS humana fue reportada previamente empleando una enzima recombinante producida en células de insecto y determinada por cristalografía de

rayos X a una resolución de 2.2 Å (PDB 4FDI) (7). La estructura de la proteína fue modificada computacionalmente usando el software YASARA versión 11.4.18, retirando las moléculas de agua y otros compuestos presentes durante la cristalización como glicerol y ácido cítrico. Del homodímero se seleccionó únicamente la subunidad A y empleando el paquete UCSF Chimera versión 1.12 (147), se realizó la optimización geométrica de la proteína con los siguientes parámetros: 100.000 pasos de minimización, 0.001 Å de tamaño de pasos de minimización, 10 pasos de gradiente conjugado, 0.001 Å de tamaño de paso de gradiente conjugado y 10 actualizaciones por intervalo. Se usó el método Gasteiger y el campo de fuerza recomendado para proteínas y péptidos AMBER ff14SB (148) para la asignación y reemplazo estándar de residuos. El método AM1-BCC fue usado para la asignación de cargas tanto para todos los aminoácidos, como para el calcio (+2) y residuo modificado de formilglicina (-1). Pasó seguido, se realizó el cálculo de probabilidad de residuos con variantes isoméricas empleando la versión académica del paquete Maestro versión 11.8.012. Finalmente se usó el paquete Pymol versión 2.0.7 (149) para la comparación de las estructuras calculando cambios en ángulos y una comparación estructural general mediante la estimación de la raíz del error cuadrático medio (RMSD, por sus siglas en inglés) para el esqueleto de la proteína.

Para finalizar esta etapa, las estructuras de la proteína se validaron usando la herramienta PDBsum (150), para evaluar la calidad estereoquímica de la estructura de la enzima analizando su geometría general y aminoácido por aminoácido. La confirmación de los aminoácidos presentes en la cavidad activa fue realizada usando la herramienta CASTp 3.0 (151) y por medio del servidor DoGSiteScorer (152) del centro de bioinformática de la Universidad de Hamburgo se realizó la predicción del sitio de enlace y su evaluación de farmacibilidad (druggability) al analizar las propiedades geométricas y fisicoquímicas de la cavidad.

7.2 Acoplamiento molecular computacional

El acoplamiento molecular de la estructura terciaria de GALNS (estado 1, para la variante probabilística geométrica del residuo Val283) con sus sustratos naturales y uno artificial se realizó empleando el programa AutoDock Vina (135). Las estructuras de la galactosa-6-

sulfato (G6S), queratán sulfato (QS, 1KES) y condroitin-6-sulfato (C6S, CID 24766) fueron obtenidas de la base de datos del PDB y PubChem, respectivamente. La estructura del ligando artificial 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranósido-6-sulfato (4MUGPS) fue previamente construida usando el programa MarvinSketch incluido en Marvin Suite (ChemAxon Ltd., Budapest, Hungary) (6). Adicionalmente, se evaluaron por acoplamiento molecular las dos moléculas identificadas previamente como potenciales chaperonas farmacológicas de GALNS (ezetimiba - ZINC3810860, y pranlukast - ZINC1542146) (9).

Una estrategia de ligandos flexibles fue utilizada para el estudio por acoplamiento molecular semi flexible mientras la estructura de la proteína se mantuvo rígida durante la interacción. En este sentido, los archivos PDB de los sustratos más el de la estructura de GALNS fueron convertidos a formato PDBQT usando AutoDock Tools para realizar los análisis de acoplamiento. En este paso se adicionaron solo los hidrógenos polares dentro de la estructura de la proteína. La caja de búsqueda fue centrada entre la FGly y el calcio dentro de la cavidad catalítica de la enzima con las coordenadas X: -0.901, Y: 0.797 y Z: -0.755; y con un tamaño de 20x20x28 para los ejes X, Y y Z, ajustada a un espaciado de 1 Å. Se obtuvieron 20 conformaciones por cada evaluación, las cuales fueron realizadas por triplicado para garantizar la reproducibilidad del resultado. Los resultados de la interacción proteína – sustrato son reportados como energía de afinidad (kcal/mol).

La evaluación de los resultados obtenidos por acoplamiento molecular se realizó con Pymol versión 2.0.7 (149) revisando manualmente la ubicación del sustrato dentro de la cavidad activa de la enzima con el grupo sulfato apuntando el fondo de la cavidad y cerca del calcio y el aminoácido no convencional formilglicina (FGly). La predicción de los aminoácidos interactuando con cada uno de los sustratos fue realizada en la herramienta Maestro versión 11.8.012, AutoDockTools-1.5.6 y LigPlot+ v.2.2.2 (153).

7.3 Tamizaje virtual

Con el fin de identificar moléculas con la capacidad de interactuar con la enzima GALNS, se realizó un tamizaje virtual empleando el paquete AutoDock Vina y siguiendo las indicaciones estándar del manual (http://vina.scripps.edu/manual.html#screening) (135).

El tamizaje virtual se realizó contra la librería de compuestos ZINC In Man de la base de datos ZINC (154). Esta librería contiene 11,421 compuestos evaluados experimentalmente en humanos e incluye fármacos aprobados por la FDA. La preparación de los compuestos (PDBQT) y el tamizaje virtual fueron llevados a cabo en el Centro de Alto Rendimiento Computacional Javeriano (http://zine.javeriana.edu.co) para soportar el trabajo computacional.

Los 20 compuestos con los menores valores de energía de afinidad fueron obtenidos con el comando *vina_screen_get_top.py* (http://vina.scripps.edu/vina_screen_get_top.py) y evaluados manualmente para confirmar su ubicación dentro del sitio activo de la enzima GALNS, como se describió anteriormente para los sustratos naturales. Para estas moléculas se reunió información farmacológica desde la misma página de ZINC Database (https://zinc.docking.org/) y por medio de una revisión de literatura sobre su forma farmacéutica e indicación para la cual ha sido estudiada.

Los eventos adversos fueron obtenidos de las bases de datos SIDER 4.1 (http://sideeffects.embl.de/) y VigiAccess (http://www.vigiaccess.org/), donde es importante mencionar que los porcentajes de prevalencia de los eventos adversos son estimados, dado que los datos contienen sospechas de reacciones adversas al medicamento, recopiladas desde informes de seguridad de casos individuales que han sido reportados en varios países, sin considerarse un registro sistemático de reacciones adversas que han ocurrido o pueden ocurrir con el medicamento de interés. Esto sumado a que estas bases de datos solo proporcionan información sobre el número de sujetos expuestos a un medicamento en particular, por lo que no es posible calcular la frecuencia real de ninguna reacción adversa al medicamento.

Por último, con las moléculas seleccionadas se amplió la información reportada sobre datos de seguridad preclínica y clínica. Además, se evaluaron las interacciones realizadas con GALNS por medio de los mismos programas usados para la evaluación de los sustratos naturales (Maestro, AutoDockTools y LigPlot+). Es importante mencionar que en este trabajo se reportan solo algunas de las potenciales interacciones, por ejemplo, aquellas generadas con los hidrógenos polares pero otro tipo de interacciones podrían ser identificadas al corregir las hibridaciones de los átomos e incluir todos los hidrógenos.

7.4 Dinámica molecular

El análisis por dinámica molecular fue realizado para las dos variantes geométricas probabilísticas de Val283 para la subunidad A. Así como para la enzima GALNS sin mutaciones, acoplada con los sustratos naturales, artificial, 7 moléculas identificadas en el tamizaje virtual y con dos potenciales chaperonas farmacológicas previamente reportadas, usando los archivos de la mejor conformación (modo de unión) obtenida a partir de la etapa de acoplamiento molecular. Para las simulaciones por dinámica molecular se usó el programa GROMACS 4.5.5 (155) y como guía base se tuvieron en cuenta los pasos descritos en los tutoriales del Dr. Justin A. Lemkul del Departamento de Bioquímica del Virginia Tech (http://www.mdtutorials.com/gmx/index.html) y la metodología empleada en estudios previos desarrollados en la evaluación de la enzima humana GALNS (6, 9). Todas las simulaciones fueron realizadas en el Centro de Alto Rendimiento Computacional Javeriano (http://zine.javeriana.edu.co), para soportar el trabajo computacional.

A continuación, se enumeran los pasos para la realización de las dinámicas moleculares:

1. Las topologías de los sustratos o compuestos y la proteína fueron preparadas de forma separada. Para los sustratos o compuestos, se obtuvo un archivo de coordenadas (.pdb) empleando la función *grep*; mientras que para la proteína se eliminaron las líneas correspondientes al sustrato o compuesto en el archivo de coordenadas del complejo.
2. La topología de la proteína se obtuvo empleando la función *pdb2gmx* y seleccionando la opción del campo de fuerza GROMOS96 43a1. Por su parte, la topología de los sustratos y compuestos fue generada usando el servidor Automated Topology Builder (ATB) and repository versión 2.2 (156), bajo condiciones estándar y obteniendo los archivos correspondientes para la topología (.itp) y estructura (.gro). Finalmente, se reconstituyó el complejo adicionando la información de la estructura del sustrato o compuesto a la de la proteína, y se incluyeron los parámetros de sustrato o compuesto en la topología del sistema (topol.top).
3. Para la solvatación, el complejo fue centrado en una caja cúbica y ubicada al menos a 1 nm de los bordes de la caja (módulo *editconf*). Posteriormente, esta caja se

llenó con el solvente (agua), utilizando el módulo *genbox* con la configuración del solvente spc216.gro.

4. Para neutralizar las cargas del sistema, se empleó el módulo *genion* reemplazando moléculas de agua por iones de Na^+. Para la preparación del archivo de entrada (.tpr) se empleó el módulo *grompp* y el archivo de parámetros de dinámica molecular (.mdp) disponible en el tutorial (http://www.mdtutorials.com/gmx/lysozyme/Files/ions.mdp).
5. Una vez se realizó la solvatación y neutralización del sistema se procedió a realizar la minimización de energía, se empleó el archivo de parámetros de dinámica molecular (.mdp) disponible en el tutorial (http://www.mdtutorials.com/gmx/lysozyme/Files/minim.mdp): A) algoritmo: *steepest descent minimization*, B) minimizar hasta que la fuerza máxima sea menor a 1000.0 $kJ/mol^{-1}/nm^{-1}$, C) tamaño del paso de minimización: 0.01, y D) máximo número de pasos de minimización: 50.000. El archivo de entrada (.tpr) se preparó empleando el módulo *grompp* y la minimización se realizó con el módulo *mdrun*. Este paso asegura que el sistema no tenga impedimentos estéricos (*steric clashes*) o geometrías inapropiadas que puedan afectar la simulación. Uno de los factores más importante a evaluar para determinar si la minimización de energía tuvo éxito, es que el valor de energía potencial debería ser negativo y en el orden de 10^5 a 10^6, dependiendo del tamaño del sistema y el número de moléculas de agua.
6. Antes de equilibrar el sistema se aplicó una fuerza de restricción de posición a los sustratos o compuestos empleando el módulo *genrestr* y actualizando el archivo de topología del sistema.
7. El equilibrio del sistema se realizó en dos etapas:
    a. La primera etapa se realizó bajo un ensamblaje en el que el número de partículas, volumen y temperatura están constantes (NVT, por sus siglas en inglés) y también denominado isotérmico-isocórico. El equilibrio se realizó durante 100 ps con una temperatura objetivo de 300 K° (http://www.mdtutorials.com/gmx/lysozyme/Files/nvt.mdp), empleando el módulo *mdrun*.
    b. En la segunda etapa se equilibró la presión del sistema empleando un ensamblaje en el que el número de partículas, la presión y la temperatura están constantes (NPT, por sus siglas en inglés). El equilibrio se realizó

durante 100 ps con una presión objetivo de 1 bar (http://www.mdtutorials.com/gmx/lysozyme/Files/npt.mdp), empleando el módulo *mdrun*.

8. Luego de completar los dos pasos de equilibrio, se realizó la fase de producción de la dinámica molecular durante 20 ns, empleando como base el archivo .mdp disponible en el tutorial (http://www.mdtutorials.com/gmx/lysozyme/Files/md.mdp). Para esta etapa se empleó el módulo *mdrun* con una paralelización basada en MPI. Es importante anotar que para algunos de los complejos se realizó un análisis adicional con una etapa de producción de 100 ns.
9. Las trayectorias fueron analizadas por la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) para los sustratos/moléculas y la proteína (módulo *rms*) y la energía de afinidad del sustrato (módulo *lie*).

8. Resultados y análisis

8.1 Estructura de GALNS.

La enzima lisosomal GALNS humana está conformada por 522 aminoácidos incluyendo un péptido señal de 26 aminoácidos. La estructura cristalina de GALNS (PDB: 4FDI) humana fue publicada por Rivera-Colon y col, (7) después de que se hubieran publicado algunos modelos de predicción de la estructura terciaria, los cuales fueron evaluados por herramientas computacionales para dilucidar la complejidad molecular de la enfermedad e intentar establecer una correlación genotipo – fenotipo para este síndrome (6, 79).

En este estudio, para la estructura cristalina se seleccionó solo la subunidad A del homodímero, con el residuo de Formilglicina (FGly) en la posición 79 (FGly79) y el calcio dentro de la cavidad catalítica de la enzima, para los posteriores análisis computacionales. Durante la evaluación de la estructura de GALNS se detectó en la subunidad A, la presencia de una valina como residuo variable isomérico ubicado en la posición 283 (Val283). Este residuo mostró dos posiciones alternas con una posibilidad del 50%. Esta probabilidad de transición entre los estados isoméricos podría significar que ambas variantes isoméricas son igualmente probables en la estructura de GALNS y la transición podría ser inespecífica o aleatoria.

Geométricamente, se identificaron cambios de ángulo inferiores a 3 grados entre los enlaces para las variantes isoméricas y un cambio de orientación de 180° entre isoformas para los grupos metilo en la región alifática radical no polar del residuo (Figura 6). Una comparación estructural de GALNS con el estado 1 y 2 del residuo Val283 mediante la determinación del RMSD mostró un valor de 0.013 Å al sobreponer el esqueleto (backbone) de la enzima en los dos diferentes estados alternos, aunque este valor se espera que sea bajo independientemente de la orientación de la cadena de valina.

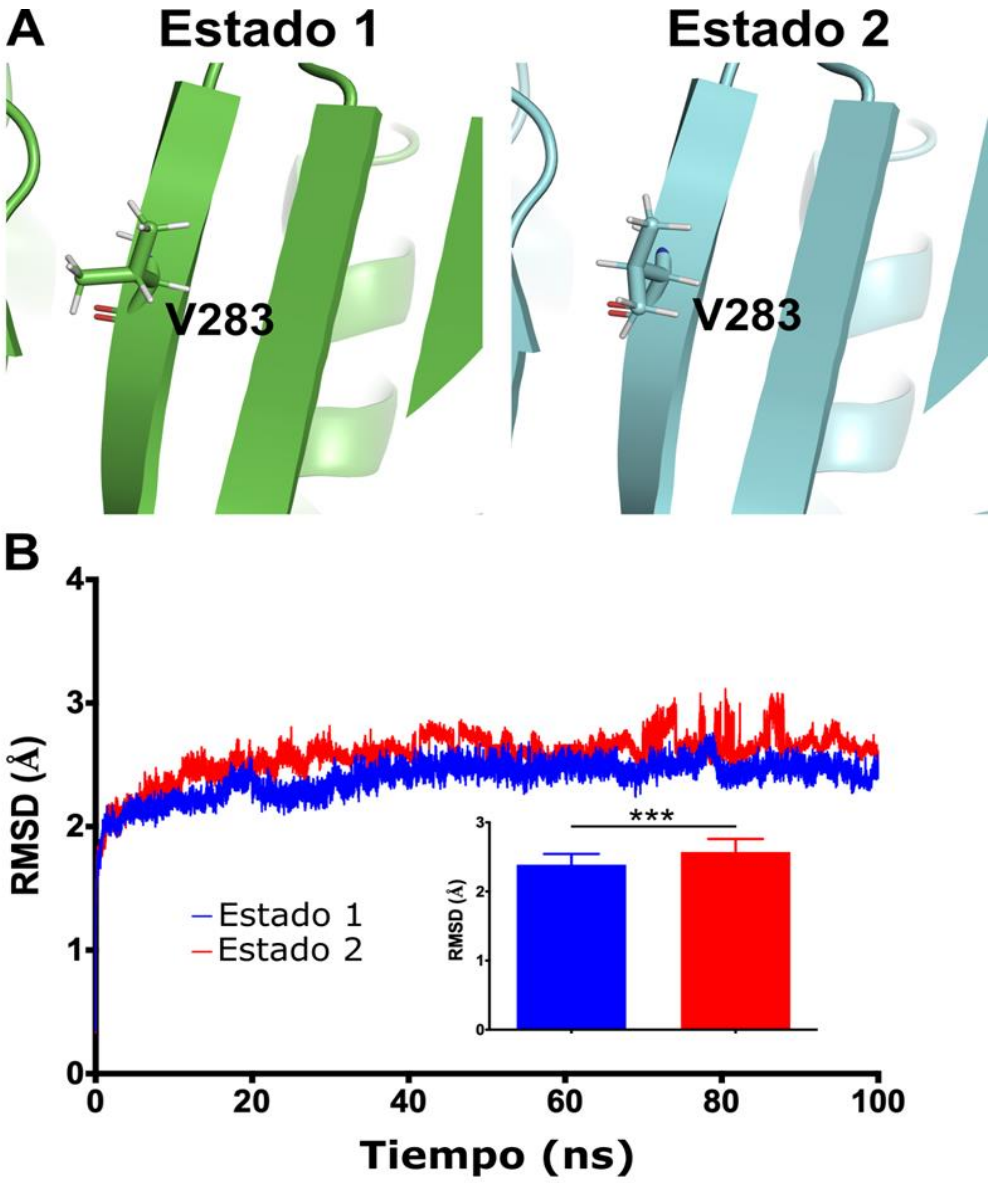


Figura 6: A. Isómeros geométricos de Val283 en la estructura de la proteína GALNS. B. Simulación de dinámica molecular para GALNS con ambos isómeros geométricos de Val283. Las trayectorias de la proteína fueron analizadas por RMSD y en la figura se muestra el promedio de RMSD durante la simulación de 100 ns. (t test, *** $p < 0.0001$).

Mediante la evaluación por dinámica molecular se predijo un RMSD significativamente más bajo para la estructura principal de la proteína en el estado 1, luego de 100 ns de simulación, en comparación con la predicha para la estructura en el estado 2 ($p < 0,0001$). Estos resultados sugieren que el estado 1 de la proteína es posiblemente más estable y al no estar el residuo Val283 presente en el sitio activo de la enzima, se utilizó en este trabajo el estado 1 de la estructura para las etapas posteriores.

El paso correspondiente a la energía de minimización fue desarrollado y la estructura resultante fue validada mediante un análisis por la gráfica de Ramachandran (comprobación de la calidad estereoquímica de una estructura proteica), mostrando que el 99,8% de los aminoácidos están dentro de las dos regiones más favorables (Tabla 2), lo cual es más alto que los resultados obtenidos para la estructura cristalina de GALNS humana disponible en el PDB (99,3%), al igual que más altos que para los modelos evaluados de GALNS previamente y reportados por Sudhakar y Mahalingam, 2011 de 96,8% (79) y por Olarte-Avellaneda y col, 2014 que fue del 97.9% (6). Por lo anterior, estos resultados validan la estructura terciaria obtenida y seleccionada para los análisis por acoplamiento molecular.

Tabla 2. Resultados de la evaluación de la calidad de las estructuras.

Estructura	Regiones más Favorables %	Regiones adicionales permitidas %	Suma de las regiones más favorables y adicionales permitidas %
4FDI (PDB)	85.8	13.5	99.3
4FDIA_State1	83.9	15.9	99.8
4FDIA_State2	83.6	16.1	99.8

GALNS, al igual que todas las proteínas de la familia de las sulfatasas humanas, se caracterizan por la conversión de una cisteína (Cys79) a formilglicina (FGly) dentro del sitio activo, mediado en eucariotas por la enzima generadora de formilglicina (63), que reconoce un motivo conservado donde está la cisteína conservada y esta modificación está relacionada con la actividad catalítica de las sulfatasas.

En los modelos de estructura terciaria de GALNS realizados previamente, no fue posible incluir la modificación de Cys a FGly, porque los programas de acoplamiento como AutoDock Vina (135) y Molegro Virtual Docker (157), no la reconocían como un aminoácido sino como un ligando, interfiriendo en el modelamiento de la interacción enzima – sustrato y no permitiendo analizar correctamente los enlaces que realizan los residuos con el sustrato. Por lo tanto, todos los análisis de acoplamiento eran llevados a cabo con la Cys79 dentro del modelo de GALNS, lo cual significa que este es uno de los primeros estudios computacionales evaluando la interacción enzima-ligando con la estructura cristalina incluyendo la FGly dentro la cavidad catalítica de GALNS. En la estructura evaluada en

este trabajo y en las imágenes reportadas a lo largo del presente estudio este residuo se denotará como DDZ79.

Los residuos primarios del sitio activo descritos para la estructura cristalina de GALNS son Asp39, Asp40, DDZ79 (Cys79), Arg83, Tyr108, His142, His236, Asp288, Asn289 y Lys310 (7), los cuales también han sido identificados dentro del sitio activo de otras enzimas del grupo de las sulfatas como las arilsulfatasas A, B y C (ARSA, ARSB y ARSC), así como, en el homólogo de la arilsulfatasa en *P. aeruginosa* (64). A pesar de que una evaluación de la interacción enzima – sustrato ha sido realizada para GALNS con un modelo tridimensional de la enzima, reportándose los residuos que interactúan con los sustratos C6S, N-acetilgalactosamina-6-sulfato (NAc-Gal-6S), G6S y el artificial, como son Asp39, Asp40, Leu78, Cys79, Ser80, Arg83, Thr100, Ala102, Tyr108, His103, His142, Cys165, Tyr181, His236, Asp288, Asn289, Lys310, Gln311, Asn407, Trp409, Glu410 y Ca^{2+} (6); la ratificación de los aminoácidos claves en la interacción de la enzima cristalina con cada uno de los sustratos no ha sido establecida y documentada, siendo importante confirmar los residuos esenciales de la actividad catalítica y determinar el rol de algunos residuos no observados previamente que podrían establecer algún tipo de enlace o interacción proteína – sustrato.

Para confirmar los aminoácidos presentes en la cavidad activa, en el servidor CASTp 3.0 se realizó la detección y caracterización de las cavidades presentes en la estructura de GALNS, identificándose que el bolsillo más grande tiene un área de superficie accesible de 608.007 $Å^2$. A su vez, se predijo que los aminoácidos que hacen parte del sitio activo son: Asp39, Asp40, Leu78, Ser80, Ser82, Arg83, Arg105, Asn106, Ala107, Tyr108, Pro110, Gln111, Glu112, Lys140, His142, Asn164, Cys165, Phe167, Tyr170, Arg175, Ile178, His236, Ala237, Asp288, Asn289, Ala292, Leu293, Ile294, Ser295, Gly309, Lys310, Gln311, Arg386, Trp405, Asn407, Ser408, Asn411, Ile416, Phe418, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520, Ser521 e His522. En general, son los mismos residuos claves predichos previamente en la interacción con sustratos (6). Así mismo, esa cavidad fue detectada por DoGSiteScorer como el bolsillo de mayor volumen (1240.0 $Å^3$) y posibilidad de interactuar con un fármaco, al obtener una puntuación de Drug Score de 0,8 (rango de 0 a 1, entre más alto sea el puntaje indica mayor probabilidad de interacción con una molécula tipo fármaco.

8.2 Posibles interacciones de GALNS humana con sus sustratos.

Previamente ha sido reportada la presencia del ion calcio dentro del sitio activo de la proteína GALNS (7, 78), así como en otras sulfatasas humanas (64). La interacción con esté ion divalente es coordinado por los aminoácidos Asp39, Asp40, DDZ79, Asp288 y Asn289 localizados en el fondo de la cavidad catalítica. La interacción de GALNS con sus sustratos fue evaluada usando las estructuras de los sustratos naturales QS, C6S y el monómero G6S, así como la del sustrato artificial (4MUGPS), el cual es importante incluirlo para conocer la diferencia en la afinidad de GALNS por sus sustratos naturales versus el artificial, debido a que este es el utilizado para la determinación enzimática, como parte del proceso de diagnóstico de la MPS IVA. Uno de los criterios de evaluación para seleccionar la ubicación correcta obtenida luego del acoplamiento molecular, fue que el grupo sulfato de los sustratos estuviera localizado al fondo de la cavidad cercano a los residuos catalíticos (158), incluyendo el residuo de FGly.

Este es el primer análisis computacional para la enzima GALNS en el que se evalúa su interacción frente al queratán sulfato (QS), mostrando ser más afín por este sustrato natural que por el C6S (-8.4 kcal/mol vs -7.8 kcal/mol, respectivamente), lo cual se puede correlacionar con la actividad biológica de esta enzima (3). En la tabla 3 se reportan los aminoácidos que realizaron interacciones con cada uno de los sustratos mediante la evaluación en tres diferentes programas: Maestro, AutoDock Tools y LigPlot+ y en la Tabla 4 se establece un consenso de las interacciones realizadas por GALNS.

Como se observa en la Figura 7A, GALNS podría interactuar con el C6S por medio de los aminoácidos Asp40, Leu78, DDZ79, Ser80, Asn106, Ala107, Tyr108, Lys140, His142, Cys165, His236, Ala292, Ile294, Lys310, Gln311, Leu519, Trp520, Ser521 e His522, a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Figura de las interacciones por AutoDock Tools está disponible en el anexo 1). Del mismo modo, los resultados del acoplamiento con el monómero G6S se muestran en la Figura 7B interactuando con Leu78, Asn106, Tyr108, His142, His236, Lys310, Gln311, Asn411, Ile416, Phe418 y Ser521. En la Figura 7C se observa la estructura terciaria de GALNS con el QS y el ion de calcio.

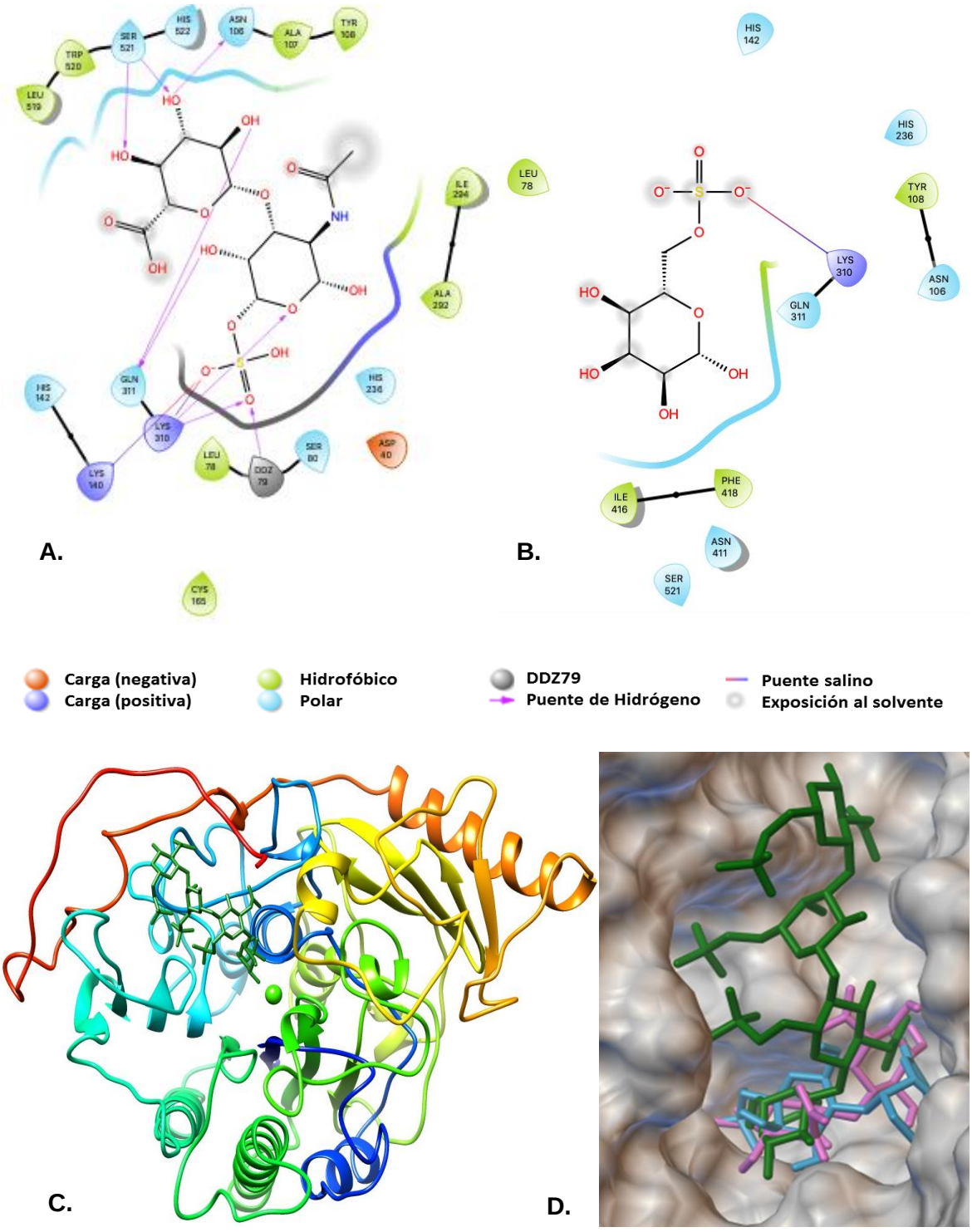


Figura 7: Acoplamiento Molecular de GALNS con su sustrato natural A) condroitin-6-sulfato y B) galactosa-6-sulfato. C) Estructura terciaria de GALNS, en verde oscuro la estructura del sustrato queratán sulfato y el ion de calcio es mostrado como una esfera verde. D) Cavidad activa con QS (Verde), C6S (Violeta) y 4MUGPS (Azul).

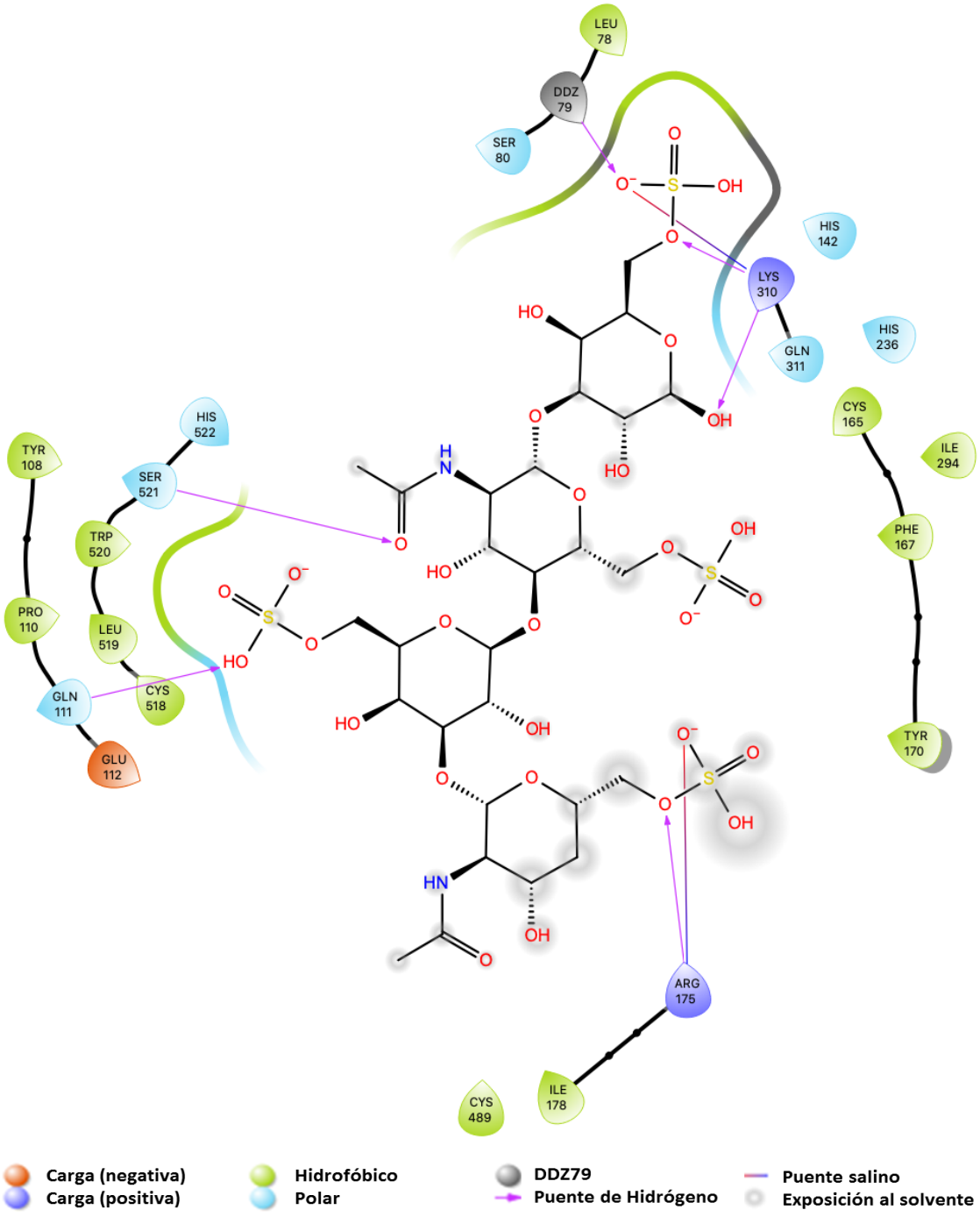


Figura 8: Acoplamiento Molecular de GALNS con queratán sulfato.

Adicionalmente, en la Figura 7D se puede observar cómo se ubica el sustrato QS dentro de la estructura terciaria de GALNS humana. La ampliación sobre la imagen en la cavidad activa permite evidenciar como cada parte del sustrato encaja dentro de las prolongaciones

y concavidades de la enzima, en una conformación similar a la predicha para los otros sustratos evaluados (C6S y 4MUGPS).

GALNS interactúa con QS con una energía de afinidad de -8.4 kcal/mol por medio de los aminoácidos DDZ79, Gln111, Arg175, Lys310 e Ser521 a través de puentes de hidrógeno y por interacciones hidrofóbicas con Leu78, Ser80, Tyr108, Pro110, Glu112, His142, Cys165, Phe167, Tyr170, Ile178, His236, Ile294, Gln311, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520 e His522 (Figura 8 y Tabla 3), y las evaluadas por AutoDock Tools están disponibles en la imagen del anexo 2.

Por último, para el sustrato artificial 4MUGPS se predijo una energía de afinidad de -7.6 kcal/mol, y las interacciones son mostradas en la Figura 9 y resumidas en la Tabla 3. Los aminoácidos Leu78, DDZ79, Ser80, Asn106, Tyr108, Lys140, His142, Cys165, His236, Ile294, Lys310, Gln311, Asn411, Ile416, Phe418, Trp520 y Ser521 mostraron interacciones hidrofóbicas o por puentes de hidrógeno. En el anexo 3 se muestran las figuras obtenidas por LigPlot+ para las interacciones de GALNS con sus sustratos naturales y el artificial 4MUGPS.

El valor de energía de afinidad predicha más baja en la interacción de GALNS con los sustratos evaluados se observó con QS, la cual es menor que la obtenida con 4MUGPS (-8.4 kcal/mol vs -7.6 kcal/mol, respectivamente), lo cual plantea que GALNS es más afín por sus sustratos naturales que por el artificial, como se había descrito anteriormente para los sustratos naturales y artificial de la enzima ARSA (158) y para los análisis de acoplamiento molecular con la estructura predicha de GALNS (6).

Estos resultados sugieren que los aminoácidos importantes en el mecanismo catalítico de GALNS que están involucrados en la interacción con los sustratos evaluados, generalmente son: Leu78, DDZ79, Asn106, Tyr108, His142, His236, Ile294, Lys310, Gln311, Trp520 y Ser521 (Tabla 4), sugiriendo la importancia de estos residuos en la interacción GALNS – sustrato. Esto a su vez sugeriría que los aminoácidos que interactúan con el grupo sulfato de los sustratos son altamente conservados en especies y en sulfatasas; mientras los otros residuos que interactúan con la cadena de carbono de los sustratos son quienes contribuirían a definir la especificidad por el sustrato (101).

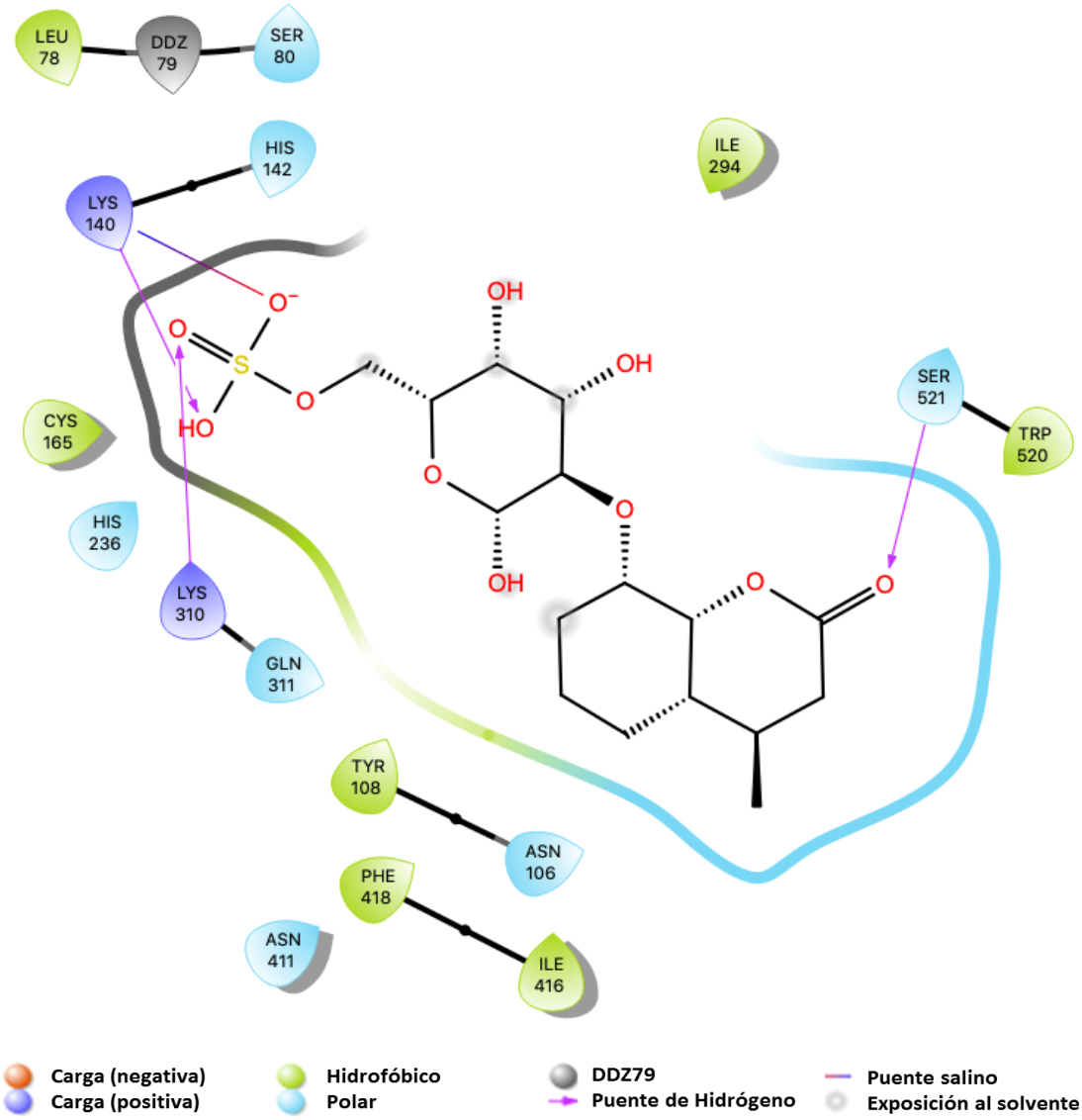


Figura 9: Acoplamiento molecular de GALNS con el sustrato artificial (4MUGPS) empleado en la determinación de la actividad enzimática.

Previo a la busqueda de nuevas moleculas con potencial para ser evalaudas como CFs de GALNS humana, se evaluó mediante acoplamiento molecular las estructuras de ezetimiba (Figura 10) y pranlukast (Anexo 4) que han sido reportadas como potenciales CFs de esta enzima lisosomal (9) y las interacciones son resumidas en las tablas 3 y 4. De modo general, se observó que estos compuestos se ubicaron dentro de la cavidad activa realizando algunas interacciones en común con los aminoacidos Leu78, Asn106, Tyr108, Ile294, Gln311 y Ser521, presentes en la interacción con los sustratos naturales y el artificial.

Tabla 3. Residuos de GALNS que interactúan con sus sustratos naturales, artificial, ezetimiba y pranlukast por acoplamiento molecular computacional. Resultados obtenidos en Maestro, AutoDock Tools y LigPlot+. En negrilla se resaltan los aminoácidos que realizan una interacción por medio de puente de hidrógeno.

Sustrato	Energía afinidad kcal/mol	Interacciones (Maestro)	Interacciones (AutoDock)	Interacciones (LigPlot+)
Condroitín -6-sulfato	-7.8	Asp40, Leu78, **DDZ79**, Ser80, **Asn106,** Ala107, Tyr108, Lys140, His142, Cys165, His236, Ala292, Ile294, **Lys310, Gln311,** Leu519, Trp520, **Ser521,** His522.	DDZ79, Ser80, Asn106, **Tyr108,** Lys140, His142, His236, Ile294, **Lys310, Gln311,** Trp520, Ser521.	Leu78, DDZ79, **Asn106, Tyr108** His142, **His236,** Ile294, **Lys310 Gln311,** Trp520, **Ser521**.
Queratán sulfato	-8.4	Leu78, **DDZ79,** Ser80, Tyr108, Pro110, **Gln111**, Glu112, His142, Cys165, Phe167, Tyr170, **Arg175,** Ile178, His236, Ile294, **Lys310,** Gln311, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520, **Ser521,** His522.	Leu78, **DDZ79** Tyr108, **Gln111,** Glu112, His142, **Arg175,** Ile294, **Lys310,** Trp520, **Ser521.**	Leu78, **DDZ79, Tyr108,** Pro110, **Gln111,** Glu112, His142, Phe167, **Arg175, His236,** Ile294, **Lys310,** Cys489, Trp520, **Ser521,** His522.
Galactosa 6-sulfato	-5.6	Leu78, Asn106, Tyr108, His142, His236, Lys310, Gln311, Asn411, Ile416, Phe418, Ser521.	Leu78, Asn106, Tyr108, Lys310, Gln311, Phe418, Ser521.	Leu78, **Asn106,** Tyr108, His236, **Lys310,** Gln311, **Ser521**.
4MUGPS	-7.6	Leu78, DDZ79, Ser80, Asn106, Tyr108, **Lys140,** His142, Cys165, His236, Ile294, **Lys310,** Gln311, Asn411, Ile416, Phe418, Trp520, **Ser521.**	Asn106, Tyr108, **Lys140,** His142, Ile294, **Lys310,** Gln311, Ile416, Phe418, Ser521.	DDZ79, Asn106, Tyr108, **Lys140,** His142, **His236,** Ile294, **Lys310,** Gln311, Ile416, Phe418, Trp520, Ser521.

Molécula	Energía afinidad kcal/mol	Interacciones (Maestro)	Interacciones (AutoDock)	Interacciones (LigPlot+)
Ezetimiba	-8.6	Leu78, DDZ79, Ser80, Asn106, Tyr108, Lys140, His142, His236, Ala237, Ala292, Ile294, Ser295, Lys310, Gln311, Phe418, Leu519, Trp520, Ser521, His522.	Leu78, DDZ79, Asn106, Tyr108, His142, His236, Ala237, Ile294, Ser295, Lys310, Gln311, Phe418, Ser521.	Leu78, **DDZ79, Asn106,** Tyr108, His142, His236, Ile294, **Ser295,** Lys310, Gln311, Ser521.
Pranlukast	-8.1	Leu78, Asn106, Tyr108, Pro110, Glu112, Phe167, **Tyr170**, Arg175, Ile294, Gln311, Asn411, Ile416, Phe418, Trp520, Ser521.	Asn106, Tyr108, Pro110, Ile294, Gln311, Ile416, Phe418, Ser521.	Asn106, **Tyr108,** Pro110, Glu112, Phe167, Arg175, Ile294, Gln311, Ile416, Phe418, Ser521.

El residuo Gln311 que no está completamente conservado entre especies (8), podría interactuar con el sustrato natural C6S, monómero G6S y el sustrato artificial. Previamente, este aminoácido fue reportado interactuando solo con 4MUGPS, revelando el potencial que podría tener este residuo en la unión al sustrato y que no pudo ser observada con los modelos estructurales de GALNS usados en estudios previos (6).

Adicionalmente, los aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína como Trp520, Ser521 e His522 fueron predichos en la interacción de GALNS con la cadena de carbono de los sustratos. Estos no habían sido observados previamente en las evaluaciones de acoplamiento molecular con la predicción de la estructura terciaria de la enzima, lo cual podría deberse a que entre la estructura cristalina y el modelo de GALNS las principales diferencias estaban al final del dominio C-terminal y en giros localizados en la superficie de la proteína (6). Estas pequeñas variaciones podrían modificar la interacción enzima – sustrato al cambiar levemente la orientación del sustrato dentro de la cavidad, especialmente en la parte terminal que queda hacia la entrada del sitio activo. Como fue reportado previamente, en la estructura cristalina se muestra una nueva conformación donde la región C-terminal forma una barrera a la entrada de la cavidad activa

contribuyendo a la selectividad del sustrato (7), permitiendo este estudio confirmar los aminoácidos substanciales para el acoplamiento enzima – sustrato, como es Ser521 que estuvo presente en la interacción con los 4 sustratos al ser evaluado en los tres programas.

Por otra parte, los aminoácidos Ile416 y Phe418 realizan interacciones de tipo hidrofóbico con el sustrato artificial, pero no se vieron involucrados en la interacción con los sustratos naturales C6S ni QS, lo que permitiría suponer que estos residuos generalmente no tendrían un papel esencial en la interacción enzima – sustrato, pero si son importantes en la interacción con moléculas exógenas, pudiendo ser relevantes en la interacción con moléculas pequeñas que se unan a la enzima dentro del sitio activo de GALNS. Esto tiene aún más sentido al evaluar por acoplamiento molecular las dos CFs potenciales previamente reportadas (9), dado que para pranlukast también se observa la interacción de estos dos aminoácidos en los tres programas, mientras con ezetimiba solo la interacción hidrofóbica con Phe418 fue detectada.

Para la enzima Arilsulfatasa C (ARSC) se ha propuesto que los aminoácidos Arg79, Lys134, His136, His290 y Lys368 participan en el mecanismo catalítico de la ARSC y pueden extenderse a otras sulfatasas (64). Estos aminoácidos corresponden a Arg83, Lys140, His142, His236 y Lys310 dentro de la estructura de GALNS. En efecto, resultados similares han sido descritos para los aminoácidos involucrados en la unión al sustrato en la ARSA (158) y en este estudio se vieron interacciones claves preferencialmente con los últimos tres en la enzima GALNS humana, mostrando su rol esencial para la remoción o modificación del grupo sulfato de los sustratos sobre los que cada una de estas enzimas actúa.

A diferencia de lo anteriormente descrito para sulfatasas y con resultados previos en GALNS, en este estudio no se observó interacción de Arg83 con los sustratos (previamente reportadas con G6S) y para Lys140 en este análisis solo se evidenció interacción con C6S y el sustrato artificial, no antes vista en evaluaciones por acoplamiento molecular con GALNS humana con ningún sustrato, incluyendo el monómero N-acetilgalactosamina no evaluado en este estudio. De hecho, en GALNS producidas por otras especies, la Lys140 interactúo con los diferentes sustratos excepto para la enzima humana (8). Dado que los aminoácidos Arg83 y Lys140 están completamente conservados en sulfatasas y en la

enzima GALNS presente en otras especies, se podría sugerir que estos aminoácidos son claves en la geometría del sitio activo y en la interacción con la enzima generadora de formilglicina porque hace parte del motivo de reconocimiento. Posiblemente Arg83 y Lys140 no generen interacciones con sus sustratos (a nivel *in-silico* generalmente no interactúan), a diferencia de His142, His236 y Lys310, que tendrían un papel clave en la interacción con los sustratos naturales y en la actividad catalítica. Además, todos estos aminoácidos podrían ser importantes proporcionando la carga positiva a la cavidad activa que permite atraer el sulfato del sustrato y en conjunto pueden ser indispensables en pasos catalíticos específicos en la función de esta enzima lisosomal.

Tabla 4. Consenso de las interacciones de GALNS con los sustratos naturales, el artificial y dos potenciales chaperonas farmacológicas por acoplamiento molecular computacional. Rosado: Interacción por un solo programa, Verde: Interacción en dos programas, Azul: Interacción en los tres programas (Maestro, AutoDock Tools y LigPlot+).

Residuos	C6S	QS	G6S	4MUGPS	Ezetimiba	Pranlukast
Asp40						
Leu78						
DDZ79						
Ser80						
Asn106						
Ala107						
Tyr108						
Pro110						
Gln111						
Glu112						
Lys140						
His142						
Cys165						
Phe167						
Tyr170						
Arg175						
Ile178						
His236						

Residuos	C6S	QS	G6S	4MUGPS	Ezetimiba	Pranlukast
Ala237						
Ala292						
Ile294						
Ser295						
Lys310						
Gln311						
Asn411						
Ile416						
Phe418						
Cys489						
Cys518						
Leu519						
Trp520						
Ser521						
His522						

Como fue reportado recientemente (159), la evaluación con el residuo modificado (DDZ79) por el residuo convencional Cys79 permite disminuir los valores de energía de afinidad mostrando nuevamente la importancia de trabajar con la enzima cristalina que contiene la modificación postraduccional. Por lo tanto, para esta comparación también es importante discutir los valores de energía de afinidad obtenidos por Tapiero, 2016 (160), quien evaluó computacionalmente por acoplamiento molecular de GALNS silvestre y con las mutaciones más frecuentes encontradas en una cohorte de pacientes colombianos. En este estudio se reportan las siguientes energías de afinidad para C6S (-6,80 kcal/mol), QS (-8,10 kcal/mol) y N-acetilgalactosamina-6-sulfato (-5,9 kcal/mol) con GALNS sin mutaciones; los análisis fueron realizados con un modelo de la enzima obtenido a partir de la estructura cristalina, donde está presente Cys79 en el sitio activo en vez del aminoácido modificado ya presente en la estructura disponible en el PDB y los resultados del acoplamiento fueron seleccionados por su mejor energía de afinidad. A diferencia de ese estudio, en el presente proyecto se consideró otra variable como fue la ubicación (acoplamiento) del sustrato dentro del sitio activo, en especial la dirección del grupo sulfato, para seleccionar el mejor

resultado con base en lo reportado en trabajos previos (6, 7), obteniéndose valores más bajos de energía de afinidad.

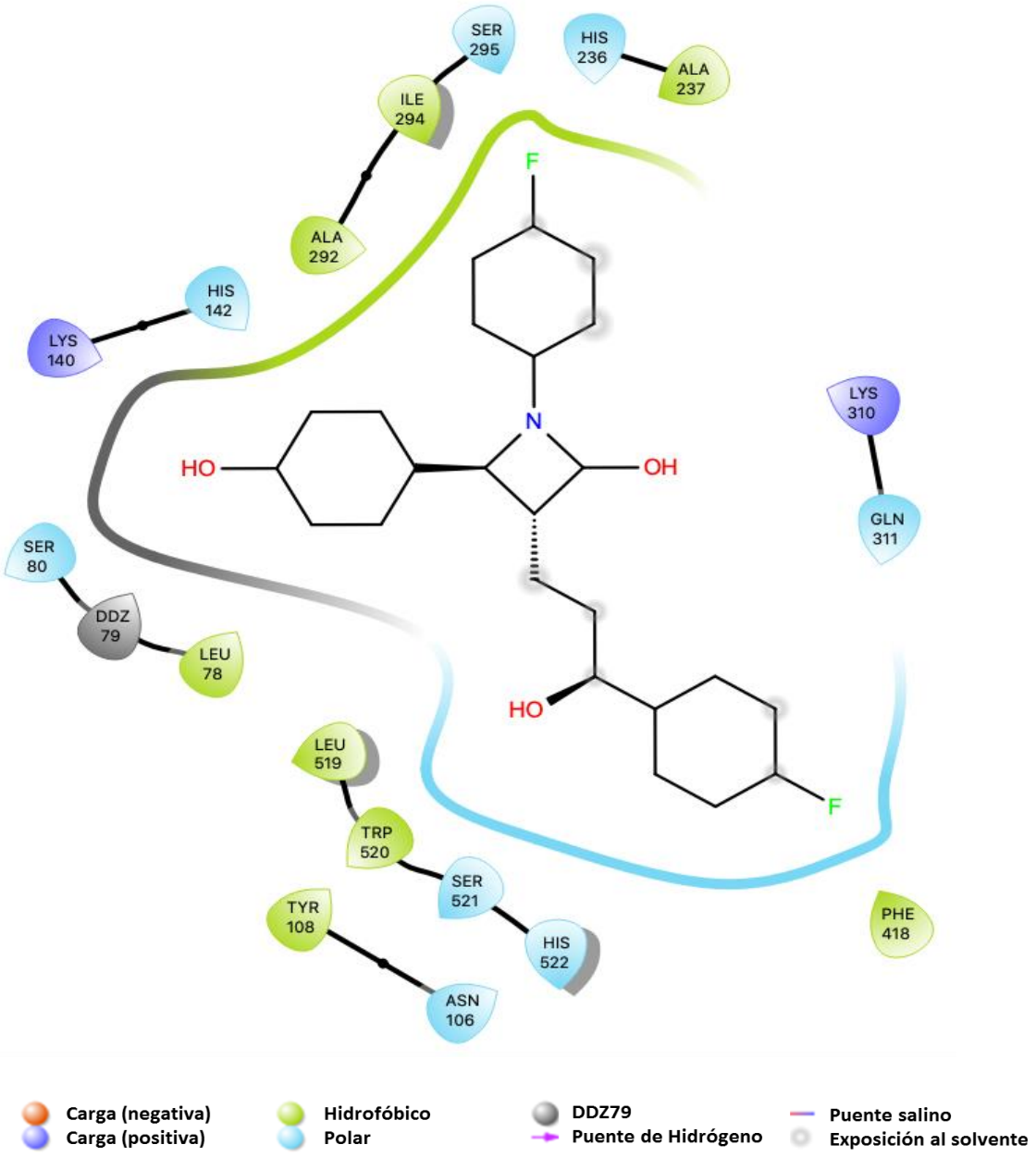


Figura 10: Acoplamiento molecular de GALNS con ezetimiba.

Los valores de energía de afinidad obtenidos en este estudio no pueden ser comparados directamente con los resultados reportados usando el modelo de estructura terciaria de GALNS (6), porque en ese análisis fue utilizado el programa Molegro Virtual Docker en

lugar de AutoDock Vina como en este estudio, siendo los valores expresados en otras unidades y calculados mediante algoritmos diferentes. Lo que sí pudo observarse es que GALNS también mostró ser más afín por su sustrato natural que por el artificial. Para el modelo la energía más baja en la interacción de GALNS con los sustratos se dio con C6S porque no pudo obtenerse el acoplamiento con QS. El valor de energía de afinidad para C6S es menor que la obtenida con el sustrato artificial 4MUGPS (-173.337 kJ/mol *vs.* -121.685 kJ/mol, respectivamente) y para nuestro estudio (-7.8 kcal/mol vs 7.6 kcal/mol, respectivamente), confirmando que GALNS es más afín por sus sustratos naturales que por el artificial.

Finalmente, la información generada de este análisis computacional confirma los aminoácidos importantes en el mecanismo catalítico y que están involucrados en la interacción enzima-sustrato, contribuyendo a aumentar el conocimiento del sitio activo de GALNS, con el objetivo de buscar moléculas pequeñas con potencial uso como chaperonas farmacológicas especificas de esta cavidad activa, que realicen interacciones y que se acomoden de manera similar a los sustratos naturales dentro de la cavidad catalítica de esta enzima lisosomal, como una posible estrategia terapéutica. Asi mismo, en futuros estudios otro tipo de interacciones podrian ser evaluadas adicionales a las presentadas en este trabajo.

Parte de los resultados de este objetivo fueron presentados en el 14 simposio internacional de enfermedades lisosomales (WORLDSymposium) 2018 en modalidad de cartel (161) y (162), asi como en el artículo "*Bromocriptine as a novel pharmacological chaperone for mucopolysaccharidosis IV A*" publicado en la revista *ACS Medicinal Chemistry Letters* (IF 3.9, Scopus Q1) (159).

8.3 Identificación de moléculas pequeñas con potencial para interactuar dentro la cavidad activa de GALNS humana.

La estructura cristalina de GALNS (estado 1) fue empleada para realizar un tamizaje virtual computacional, frente a un listado de 11,421 compuestos presentes en la base datos ZINC in Man, la cual contiene moléculas con características de fármaco y muchas de ellas aprobadas por la FDA para diferentes indicaciones. El acoplamiento molecular fue realizado mediante AutoDock Vina, usando las mismas coordenadas y características de la caja de búsqueda usadas para evaluar la interacción de GALNS con sus sustratos naturales y el artificial. Luego del tamizaje virtual se seleccionaron los 20 compuestos con el menor valor de energía de afinidad; los cuales estuvieron entre -10.8 a -9.8 kcal/mol, considerando la primera conformación de cada compuesto. La Tabla 5 resume la información con respecto a las indicaciones estudiadas y el perfil de seguridad para cada molécula; donde el porcentaje de prevalencia para los eventos adversos más frecuentes fue establecido desde la revisión en la base de datos de SIDER y VigiAccess.

El racional para la selección inicial de posibles CFs para GALNS humana se basó en parte en los potenciales eventos adversos de la molécula y su seguridad, al ser factores de mayor preocupación en la administración a largo plazo, especialmente en un esquema de tratamiento diario, el cual sería requerido para estos pacientes. No fueron considerados para estudios posteriores aquellos compuestos con actividad analgésica, antibiótica, anticancerígena, anti-estrógenos, que actúen a nivel del sistema nervioso, corticoides y terapias inmunosupresoras. Teniendo en cuenta que el tratamiento con las chaperonas farmacológicas seria de uso continuo, este estudio no desea seleccionar fármacos con efecto sobre el sistema inmunológico, que pueda generar inmunosupresión y aumentar la probabilidad de adquirir infecciones adicionales a las que ya tienen los pacientes por su enfermedad de base, que los predispone a infecciones de oído y respiratorias (82).

Adicionalmente, el uso crónico de glucocorticoides está implicado con un impacto negativo sobre el hueso, a través de efectos directos sobre las células óseas y efectos indirectos sobre la absorción de calcio (163); aumentando el riesgo de osteoporosis en este grupo de pacientes con problemas esqueléticos y articulares. Tampoco se consideraron

compuestos con actividad antibiótica, porque se desea seleccionar un fármaco que no altere el funcionamiento del microbiota de los pacientes y que pueda aumentar el riesgo de infecciones oportunistas o favorecer un ambiente donde microorganismos realicen procesos de resistencia bacteriana.

Tabla 5. Tipo de fármacos para las 20 primeras moléculas del tamizaje virtual.

Moléculas	Indicación	Elegido	Eventos Adversos	Referencia
Molécula 1 Bromocriptina ZINC53683151	La bromocriptina es un alcaloide agonista del receptor de dopamina D2 que se había utilizado ampliamente para tratar la hiperprolactinemia, galactorrea y parkinsonismo. En el 2010 una formulación de liberación rápida fue aprobada por la FDA para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.	Si	Náuseas (7-49%) Mareos (8 – 17%) Hipotensión ortostática (6%) Aturdimiento (5%) Dolor abdominal, anorexia y dispepsia (4%) Vómitos (2-5%)	(164)
Molécula 2 Tarazepida ZINC02015955	Antagonista de la colecistocinina (CCK) – Estudiado en Gastroenterología. Disminuye la actividad eléctrica duodenal y la secreción proteica pancreática; induciendo la secreción de bicarbonato y proteínas. Se ha evaluado en administración intraduodenal.	Si	No reportados o desconocidos.	(165, 166)
Molécula 3 Talnimuflato ZINC00601275	Potente antinflamatorio y analgésico. Usado para tratar desórdenes inflamatorios como la artritis reumatoide y osteoartritis. En fibrosis quística por diferentes mecanismos como inhibir la síntesis de moco.	No	Dispepsia, somnolencia y mareos (11%) Náuseas (10%) Prurito (9%)	https://www.drugbank.ca/drugs/DB09295#reference-L1405 (167)
Molécula 4 Dexametasona -21-sulfobenzoato ZINC04212887	Presenta acción antinflamatoria y tiene poca información reportada. El perfil de seguridad debería ser muy similar a la dexametasona usada en la práctica clínica habitual, aunque la farmacocinética es diferente con una conversión lenta e incompleta en dexametasona lo que generó una menor	No	Neumonía (5%) Náuseas y diarrea (4%) Pirexia y fatiga (3%).	(168)

	supresión de linfocitos comparada con la dexametasona fosfato en un estudio farmacológico comparativo después de la administración intravenosa e intramuscular			
Molécula 5 (8S,9S,13R,14S,16S,17R)-13-Methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[a]phenanthrene-3,16,17-triol ZINC03872491	Estrógeno endógeno con propiedades antinflamatorias sin efecto inmunosupresor ni glucogénico.	No	No reportados o desconocidos.	(169)
Molécula 6 Devazepida ZINC01847292	Potente Antagonista de la colecistocinina (CCK) – Estudiado en Gastroenterología. Activo de manera oral. Incrementa significativamente la secreción hepática de colesterol biliar, aumentando el apetito y acelerando el vaciado gástrico evaluado en ratones y estudios clínicos. Se ha sugerido como un potencial tratamiento para una variedad de problemas gastrointestinales incluyendo dispepsia, gastroparesia y reflujo gástrico.	Si	No reportados o desconocidos.	(166, 170, 171)
Molécula 7 Dihidro Ergotoxina ZINC14880002	Se usa principalmente para salvar a neuronas del cerebro de lesiones y preservar las neuronas restantes mediante un aumento del flujo sanguíneo al cerebro.	No	Náuseas (15%) Mareos (9%) Cefalea, vómitos y rash (8%)	(172)
Molécula 8 Acetofénido de dihidroxi Progesterona ZINC04172334	Progestágeno que inhibe la ovulación en mujeres, usado como anticonceptivo en combinación con un estrógeno.	No	Cefalea (14%) Metrorragia (13%) Mareo y desórdenes menstruales (8%).	(173)

Moléculas	Indicación	Elegido	Eventos Adversos	Referencia
Molécula 9 Tadalafilo (6R,12aS)- ZINC00538404	Inhibidor de fosfodiesterasa 5. Este grupo de compuestos son utilizados para la disfunción eréctil, hiperplasia de la próstata benigna y en hipertensión arterial pulmonar.	Si	Cefalea (3 - 42%) Náuseas (10 -11%) Infección del tracto respiratorio (5 – 13%) Congestión nasal (9%). Disnea (6%).	(174, 175)
Molécula 10 Nimorazol ZINC26167988	Es un derivado del 5-nitroimidazol que desarrolla un efecto quimioterápico múltiple sobre tricomonas, giardias y amebas, semejante al metronidazol. Evaluado como radiosensibilizador hipóxico de la radioterapia primaria en cáncer de cabeza y cuello.	No	Náuseas (12%) Vómitos (10%) Diarrea (9%) Mareos y parestesias (7%)	(176-178)
Molécula 11 Plevitrexed ZINC27305632	Plevitrexed es un antifolato que se desarrolló como resultado de los eventos adversos de raltitrexed y pemetrexed. Estudios clínicos evaluando este medicamento continúan en desarrollo. Usado en oncología.	No	Trombocitopenia (20%) Neutropenia, pancitopenia, pirexia y escleroderma (10%)	(179)
Molécula 12 Picrotina ZINC03995861	Inhibidor del receptor de glicina homomérico alfa 2. Es el compuesto menos activo de la picrotoxina. Efecto sobre el sistema nervioso central.	No	No reportados o desconocidos	(180)
Molécula 13 Lumacaftor ZINC64033452	Junto al Ivacaftor es un medicamento para el tratamiento combinado en pacientes con fibrosis quística que son homocigóticos para la mutación F508 del gen CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística). Lumacaftor actúa como un corrector de la proteína disfuncional permitiendo una mayor expresión en la superficie.	Sí	Disnea (43%) Diarrea (22%) Náuseas y broncoespasmos (17%) Dolor abdominal (13%)	(181)
Molécula 14	Sustancia ideal para absorber la radiación ultravioleta, usada			https://www.acs.org/content/acs/e

Bisoctrizol ZINC11677911	como aditivo para formulaciones de protector solar. Es muy insoluble, por lo que se prepara en partículas microfinas que se suspenden en la fase acuosa.	No	No reportados o desconocidos	n/molecule-of-the-week/archive/b/bisoctrizole.html
Molécula 15 Palosuran ZINC34375693	Palosuran mejora la función pancreática y renal en ratas diabéticas. Los estudios clínicos de fase II para nefropatías diabéticas y trastornos cardiovasculares fueron interrumpidos. Inhibidor de la urotensina II que se propuso como una nueva opción terapéutica prometedora para la hipertensión pulmonar arterial.	Si	Cefalea (20%) Náuseas, vómitos, mareos y sudoración (10%)	(https://drugs.ncats.io/substance/ULD9ZKE457) (182)
Molécula 16 Dihidro ergotamina ZINC03978005	Alcaloides ergotínicos – Migraña.	No	Rinitis (26%) Náuseas (7 - 10%) Vómitos (4 - 5%) Dolor de pecho (4%) Somnolencia (3%)	(183)
Molécula 17 Ergocristina ZINC53282743	Alcaloides ergotínicos – Actúa a nivel del sistema nervioso. Precursor químico utilizado en la fabricación ilícita de LSD.	No	No aplica, sustancia controlada.	(184)
Molécula 18 Penfluridol ZINC04217252	Es un antipsicótico oral de acción prolongada, de primera generación, estudiado para el tratamiento de la esquizofrenia crónica, la psicosis aguda y el síndrome de Tourette. En un reciente estudio se evaluó en una línea celular de cáncer de mama resistente al paclitaxel reduciendo significativamente la supervivencia de estas células y abre una nueva vía para el uso de Penfluridol como una opción terapéutica para superar la resistencia al paclitaxel mediante la supresión de la vía HER2/ β-catenina	No	Trastorno extrapiramidal (11%) Somnolencia (5%) Temblor, acatisia y discinesia (4%)	(185, 186)

Moléculas	Indicación	Elegido	Eventos Adversos	Referencia
Molécula 19 Telmisartán ZINC1530886	Antagonista del receptor de angiotensina II usado como antihipertensivo y en la reducción de la morbilidad cardiovascular en adultos. Ha demostrado inhibir la proliferación en varios tipos de cáncer, por ejemplo, en cáncer de esófago se reportó que induce la detención del ciclo celular.	Si	Claudicación intermitente Palpitaciones Náuseas y diarrea Trastornos de la piel Vértigo	(187, 188)
Molécula 20 Eltrombopag ZINC11679756	Es un agonista del receptor de trombopoyetina; se utiliza para aumentar el recuento de plaquetas. Está indicado para tratar la trombocitopenia en pacientes adultos y pediátricos mayores de 6 años con púrpura trombocitopénica idiopática crónica y en anemia aplásica severa.	No	Tos (23%) Dolor de cabeza (10 – 21%) Diarrea (9 – 21%) Náuseas (4 – 33%) Fatiga (4 – 28%)	http://www.anmat.gov.ar/Medicamentos/ST_ELTROMBOPAG.pdf (189)

Con el fin de verificar si las moléculas seleccionadas luego del tamizaje virtual se unían correctamente en la cavidad activa de GALNS, se evaluó manualmente el acoplamiento de esos compuestos, observando que todos ellos asumieron conformaciones dentro de la cavidad activa de la enzima, en una forma similar a la predicha para los sustratos naturales y el artificial. Además, realizaron múltiples interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos claves predichos para la actividad biológica de la enzima GALNS. Los valores de energía de afinidad e interacciones reportadas por los tres programas son resumidos en la Tabla 6 para las moléculas elegidas.

La molécula bromocriptina se ubicó dentro de la cavidad activa de GALNS, en una posición similar a la de QS e interactúa por medio de los aminoácidos Leu78, Tyr108, Pro110, Gln111, Glu112, His142, Cys165, Tyr170, Arg175 y Gln311 a través de interacciones hidrofóbicas al ser evaluado por AutoDock Tools, en LigPlot+ se observó adicionalmente la interacción con Phe167 e His236 mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno con Arg175 y Gln311. Con una energía de afinidad desde -10.8 a -9.9 kcal/mol (Esto debido a que dos análogos estructurales de bromocriptina fueron encontrados en el tamizaje, pero con fines de este estudio se tuvo solo en cuenta la molécula con el menor

valor de energía de afinidad). En la Figura 11 y anexo 5, así como, en la tabla 6 son mostradas y resumidas las interacciones predichas con GALNS.

Bromocriptina es un agonista dopaminérgico selectivo para los receptores de la familia D2. Este compuesto fue sintetizado por el Dr. Flückiger, quien se propuso modificar la estructura y poner de manifiesto la acción reductora de la prolactina, sin los efectos oxitócicos o vasculares, convirtiéndose en el primer agonista de dopamina en ser aprobado para el tratamiento de pacientes. Se encuentra indicado en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, acromegalia o hiperprolactinemia con dosis iniciales de 1.25 a 2.50 mg / día y hasta 30 mg o más específicamente para el tratamiento del Parkinson (190, 191).

Posteriormente, fue reportada una nueva formulación de bromocriptina de liberación rápida que cuando se administra temprano en la mañana, parece actuar de manera centralizada para restablecer los ritmos circadianos de la dopamina y la serotonina hipotalámicas, mejorar la resistencia a la insulina y otras anomalías metabólicas. Las dosis utilizadas para tratar la diabetes (hasta 4,8 mg al día), son mucho más bajas que las utilizadas para tratar la enfermedad de Parkinson y no se han asociado con fibrosis retroperitoneal o anomalías de las válvulas cardíacas (164). En un reporte del uso basado en la evidencia para la diabetes mellitus tipo 2, la bromocriptina ha demostrado ser bien tolerada, eficaz y una opción lógica de tratamiento (192). Los principales eventos adversos reportados incluyen náuseas, mareo, vómitos, astenia, hipotensión, dolor de cabeza y estreñimiento, aunque en general es un medicamento con un perfil de efectos secundarios históricamente seguro y con eventos adversos graves muy raros (164, 191). En 2017 se reportó que la bromocriptina por acoplamiento molecular podría interactuar con varios residuos de la cavidad proteolítica de una proteasa del virus del Zika, inhibiendo la replicación del virus en múltiples ensayos *in vitro* (193).

Dos de los compuestos con el menor valor de energía de afinidad que lideraron la clasificación (tarazepida y devazepida), son antagonistas de la colecistoquinina y han sido estudiados en diferentes indicaciones de gastroenterología como dispepsia, gastroparesia, reflujo gastroesofágico, disminución de la actividad eléctrica duodenal y con potencial terapéutico para el tratamiento de desórdenes pancreáticos. Devazepida es un potente antagonista de receptor 1 de Colecistoquinina, que ha sido investigado por sus efectos

terapéuticos en enfermedades gastrointestinales y metabólicas en estudios con animales y en ensayos clínicos. Además, aumenta la susceptibilidad a la formación de cálculos biliares en ratones, al afectar la función de vaciado de la vesícula biliar, alterando el metabolismo del colesterol biliar y mejorando la absorción del colesterol intestinal (171). En estudios de laboratorio se evidenció que induce la muerte celular (apoptosis) e inhibe el crecimiento de las células del tumor de Ewing (194). También, fue estudiado para el tratamiento de la ansiedad, el cáncer y el dolor neuropático. Sin embargo, el desarrollo fue interrumpido en fases avanzadas de investigación (195), por lo cual se necesitaría de análisis más exhaustivos para determinar si usándolo como una posible CF, no tendría eventos adversos de importancia en su uso clínico y prolongado.

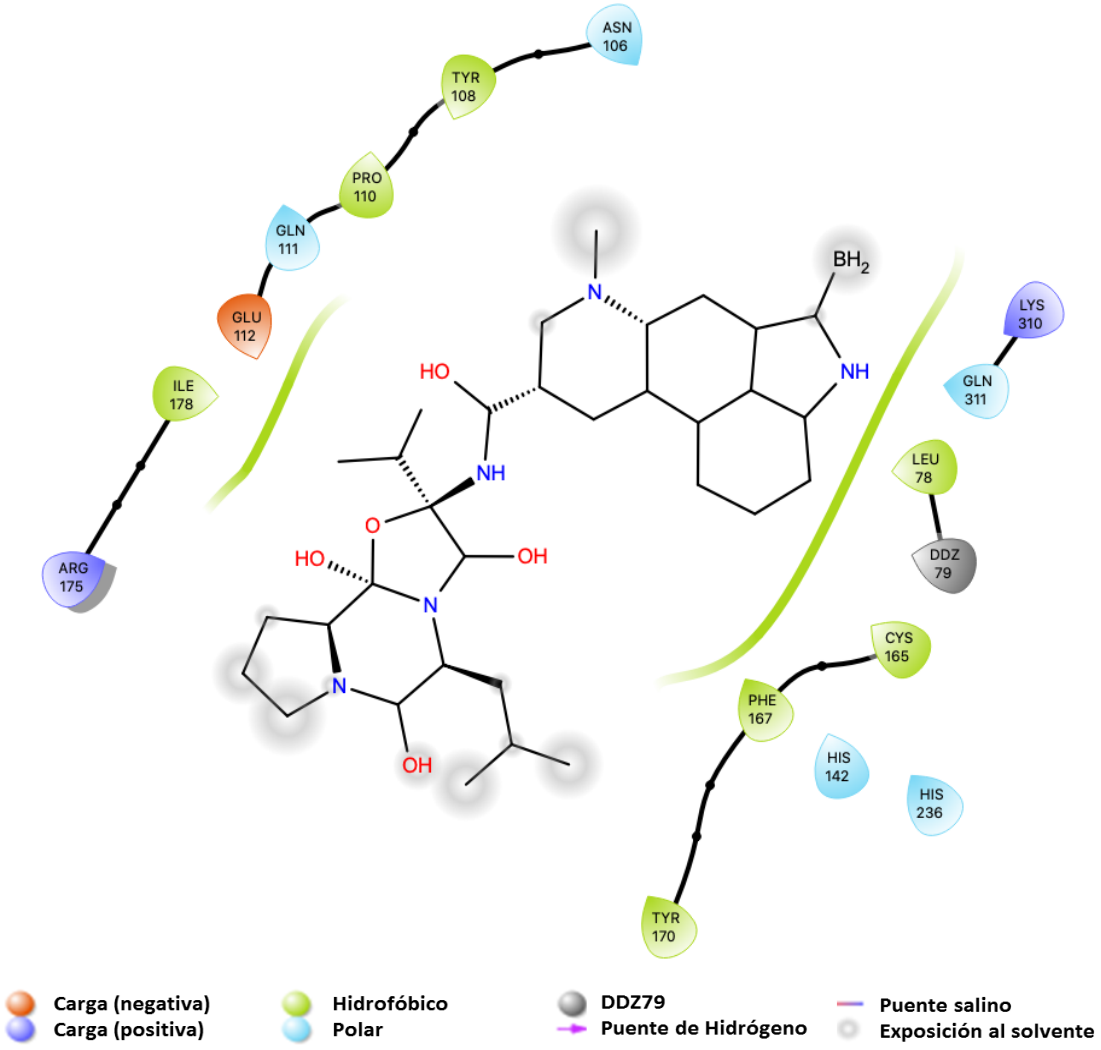
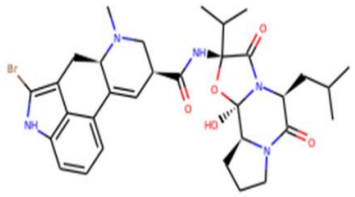
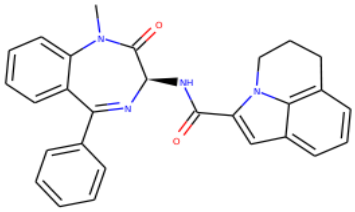
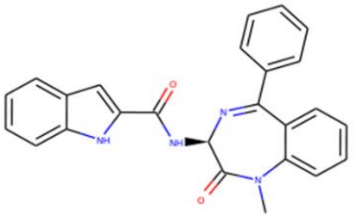
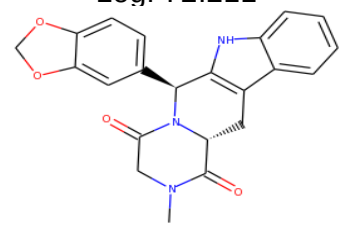
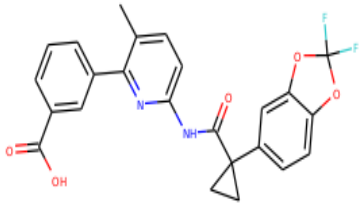
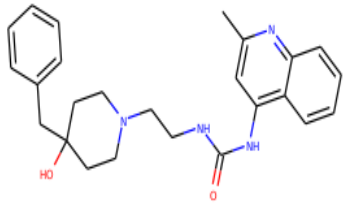
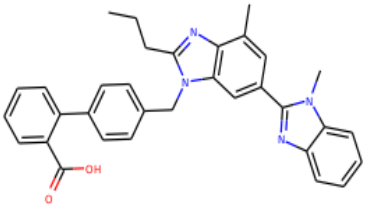


Figura 11: Acoplamiento molecular de GALNS con bromocriptina.

Tabla 6. Valores de energía de afinidad, peso molecular, LogP y residuos de GALNS que interactúan con los compuestos por acoplamiento molecular computacional. En negrilla se resaltan los aminoácidos que realizan una interacción por medio de puente de hidrógeno.

Molécula	Energía afinidad (kcal/mol)	Interacciones (Maestro)	Interacciones (AutoDock Tools)	Interacciones (LigPlot+)
Bromocriptina Peso molecular: 654.6 g/mol LogP: 3.193 	-10.8	Leu78, DDZ79, Asn106, Tyr108, Pro110, Gln111, Glu112, His142, Cys165, Phe167, Tyr170, Arg175, Ile178, His236, Lys310, Gln311.	Leu78, Tyr108, Pro110, Gln111, Glu112, His142, Cys165, Tyr170, Arg175, Gln311.	Leu78, Tyr108, Pro110, Gln111, Glu112, Cys165, Phe167, Tyr170, **Arg175,** His236**, Gln311**
Tarazepida Peso molecular: 448.5 g/mol LogP: 4.157 	-10.6	Leu78, DDZ79, Asn106, Tyr108, Glu112, Arg175, His142, His236, Ile294, Lys310, Gln311, Phe418, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520, **Ser521**, His522.	Leu78, Asn106, Tyr108, Ile294, Gln311, Leu519, Trp520, **Ser521**, His522.	Leu78, Asn106, Tyr108, Glu112, His36, Ile294, Gln311, Phe418, Cys489, Leu519, Trp520, **Ser521**, His522.
Devazepida Peso molecular: 408.4 g/mol LogP: 3.738 	-10.2	Leu78, DDZ79, Asn106, Tyr108, Glu112, His142, His236, Ile294, Lys310, Gln311, Phe418, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520, **Ser521**, His522.	Leu78, Asn106, Tyr108, Ile294, Lys310, Gln311, Leu519, Trp520, **Ser521**, His522.	Leu78, Asn106, Tyr108, Glu112, His236, Ile294, Gln311, Phe418, Cys489, Leu519, Trp520, **Ser521**, His522.
Tadalafilo (6R,12aS)- Peso molecular: 389.4 g/mol LogP: 2.211 	-10.1	Leu78, DDZ79, Asn106, Tyr108, Lys140, His142, Cys165, His236, Ile294, Phe418, Leu519, Trp520, Ser521, His522.	Leu78, Asn106, Tyr108, His142, Gln311, Phe418.	Leu78, DDZ79, Asn106, Tyr108, His142, His236, Gln311, Phe418, Trp520, Ser521.

Molécula	Energía afinidad (kcal/mol)	Interacciones (Maestro)	Interacciones (AutoDock Tools)	Interacciones (LigPlot+)
Lumacaftor Peso molecular: 452.4 g/mol LogP: 4.747 	-9.9	Leu78, **DDZ79, Ser80, Tyr108,** Pro110, Glu112, His142, Cys165, Ile294, Lys310, Gln311, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520, His522.	Leu78, **DDZ79**, Tyr108, Pro110, His142, Lys310, Cys489, Cys518, His522.	Leu78, **DDZ79**, Tyr108, Pro110, His142, Cys165, His236, Lys310, Gln311, Cys489, Cys518, **Leu519,** Trp520, His522.
Palosuran Peso molecular: 418.5 g/mol LogP: 3.734 	-9.9	Leu78, DDZ79, Ser80, Asn106, Tyr108, Pro110, Glu112, Ile113, Lys140, His142, Cys165, Phe167, His236, Lys310, **Gln311,** Phe418, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520, Ser521, His522.	Leu78, DDZ79, Tyr108, Pro110, His142, Cys165, His236, Gln311, Leu519, Trp520, Ser521, His522.	Leu78, DDZ79, Tyr108, Pro110, Glu112, His142, His236, Lys310, **Gln311,** Cys489, **Leu519,** Trp520, Ser521, **His522.**
Telmisartán Peso molecular: 514.6 g/mol LogP: 7.264 	-9.8	Leu78, DDZ79, Tyr108, Pro110, Glu112, His142, His236, Ile294, Lys310, Gln311, Ile416, Phe418, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520, Ser521, His522.	Leu78, Tyr108, Pro110, Glu112, His142, Ile294, Ile416, Leu519, Trp520, His522.	Leu78, DDZ79, **Tyr108,** Pro110, Glu112, His142, His236, Ile294, Gln311, Ile416, Leu519, Trp520, His522.

Tarazepida como se observa en la Figura 12 realiza interacciones hidrofóbicas comunes a las observadas con los sustratos naturales como son Leu78, DDZ79, Asn106, Tyr108, Glu112, Arg175, His142, His236, Ile294, Lys310, Gln311, Phe418, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520 e His522, mientras que con Ser521 se forma un puente de hidrógeno. En cuanto a devazepida (Anexo 6), también se observó un acoplamiento similar al de los sustratos naturales y ubicado de manera análoga a tarazepida, siendo fármacos altamente similares, la diferencia radica en que devazepida tiene un anillo menos en su estructura, lo cual explicaría el valor tan cercano de energía de afinidad y el realizar interacción con los

mismos aminoácidos (Tabla 6). Por los tres programas se evidencia la interacción hidrofóbica de Leu78, Asn106, Tyr108, Ile294, Gln311, Leu519, Trp520 e His522 con tarazepida y devazepida; en cambio el aminoácido Ser521 establece una interacción por puente de hidrógeno con estas dos moléculas.

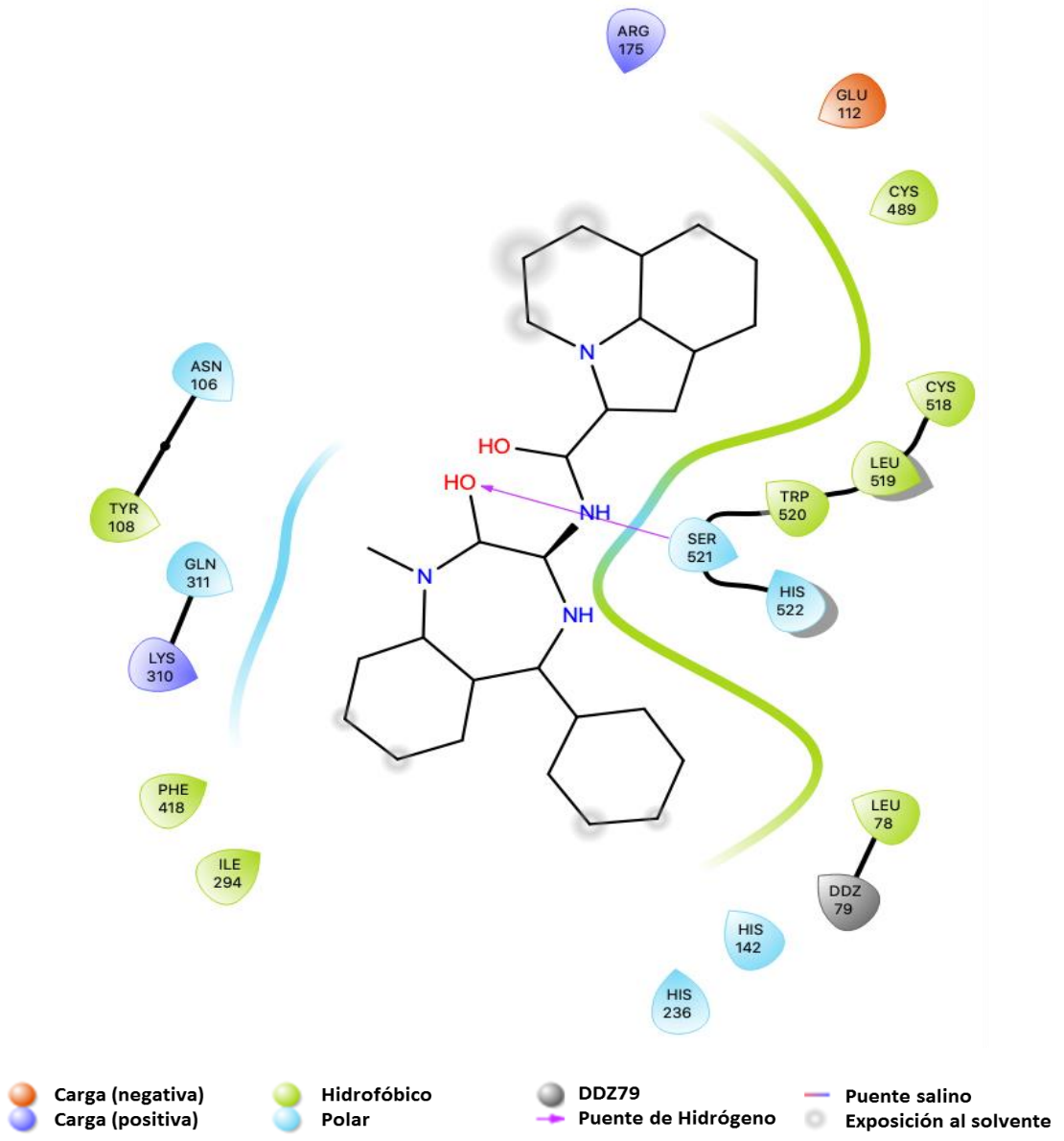


Figura 12: Acoplamiento molecular de GALNS con tarazepida.

La molécula Tadalafilo, (6R,12aS)- es un inhibidor de la fosfodiesterasa 5, este grupo de inhibidores han sido estudiados y aprobados en el manejo de la disfunción eréctil. Las reacciones adversas más comunes reportadas con estos inhibidores incluyen dolor de

cabeza, enrojecimiento, congestión nasal, nasofaringitis y dispepsia. Se han notificado informes raros pero graves de erecciones prolongadas que duran más de 4 horas y priapismo (erecciones dolorosas que duran más de 6 horas) (174). En el uso como chaperona farmacológica podría no requerir de dosis tan altas como las usadas para el manejo de la disfunción eréctil en adultos, por lo que no se esperaría que estos eventos adversos se presentaran en pacientes con esta enfermedad lisosomal. Este grupo de inhibidores también ha sido evaluado para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar y dos de ellos son recomendados como terapias de primera línea, porque se pueden usar con seguridad en pacientes pediátricos debido a que sus eventos adversos son leves y previenen la progresión de la enfermedad (175).

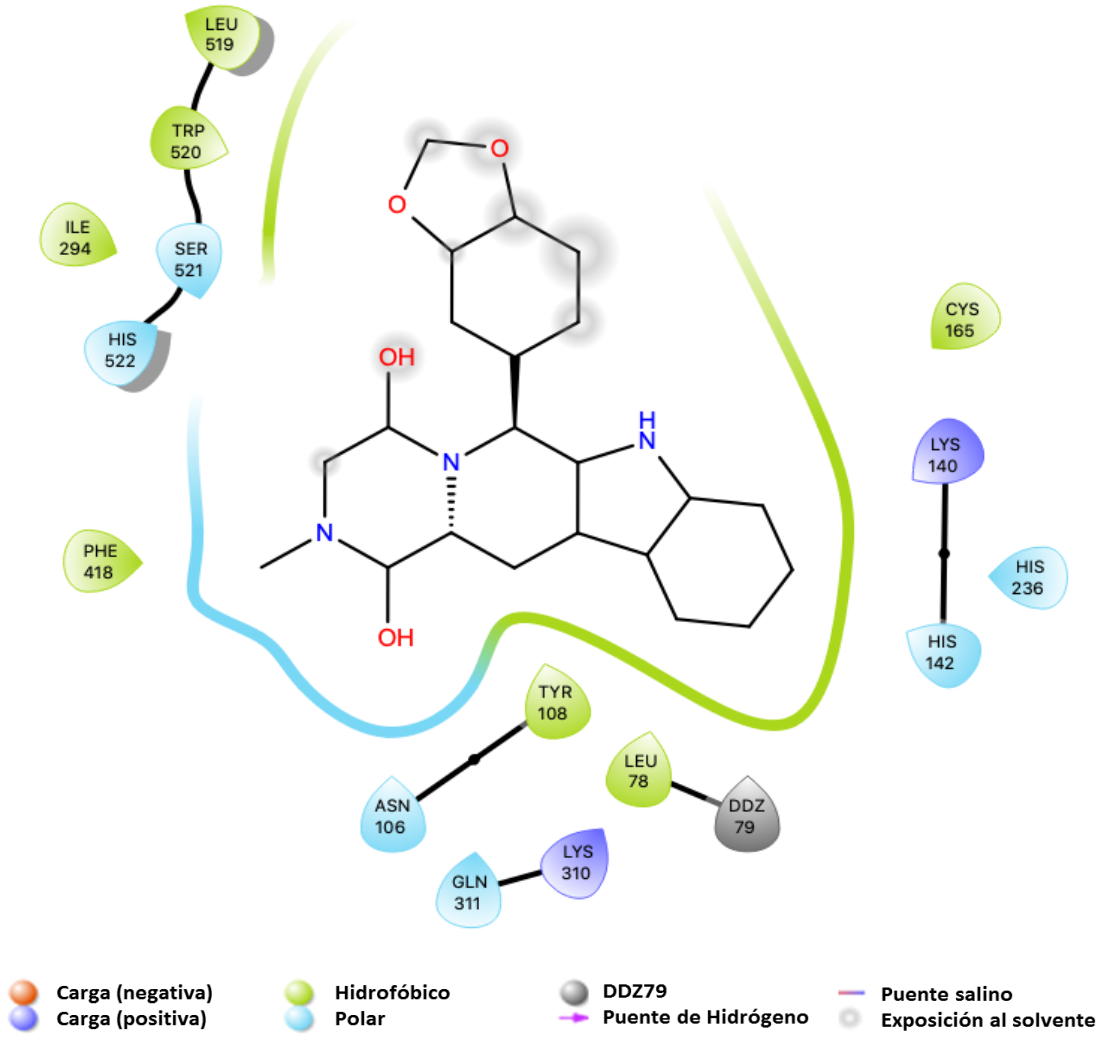


Figura 13: Acoplamiento molecular de GALNS con tadalafilo.

Los residuos Leu78, DDZ79, Asn106, Tyr108, Lys140, His142, Cys165, His236, Ile294, Lys310, Gln311, Phe418, Leu519, Trp520, Ser521 e His522, realizan interacciones de tipo hidrofóbico con la molécula tadalafilo, como se observa en la Figura 13.

A su vez, se identificó el fármaco lumacaftor, el cuál ha sido aprobado para el tratamiento de la fibrosis quística; enfermedad causada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). La mayoría de los pacientes portan la mutación CFTR F508del, que causa el plegamiento y procesamiento defectuoso de esa proteína en el retículo endoplasmático, lo que resulta en cantidades mínimas de CFTR en la superficie celular y por eso una estrategia para tratar a estos pacientes es corregir el procesamiento de CFTR F508del con moléculas pequeñas. Lumacaftor actúa como un corrector de la proteína disfuncional permitiéndole una mayor expresión en la superficie celular y está aprobado en conjunto con ivacaftor, el cual actúa como un potenciador que aumenta la función de CFTR (181, 196).

Estudios de fase III demostraron que la combinación de lumacaftor – ivacaftor proveen un beneficio clínico en pacientes con CFTR F508del, mostrando una mejoría clínica y estadísticamente significativa en la función pulmonar, con un incremento en el volumen espirado forzado en 1 segundo (FEV1) y disminuyendo el tiempo a la primera exacerbación pulmonar que llevaba a hospitalización o tratamiento antibiótico sistémico. Entre los pacientes que recibieron el medicamento, los eventos adversos que llevaron a la interrupción del tratamiento de estudio en dos o más pacientes fueron la elevación del nivel de creatina quinasa, hemoptisis, broncoespasmo, disnea, exacerbación pulmonar y erupción cutánea (197). Posteriormente, fueron reportados los datos de un estudio clínico fase III, sugiriendo eficacia y seguridad de la combinación en pacientes de 6 a 11 años (198), lo cual indica que podría ser usado en pacientes pediátricos con MPS IVA.

En un estudio computacional realizado para la búsqueda de moléculas con potencial terapéutico para la enfermedad de Alzheimer, se reportó que lumacaftor podría ser inhibidor del leucotrieno 4 sintasa con una energía de afinidad de -10.1 kcal/mol, mientras que para este estudio en la interacción con GALNS se obtuvo un valor de -9.9 kcal/mol. Adicional lo proponen como un buen candidato para establecer una terapia multiblanco para el Alzheimer, al inhibir tanto la LTC4 sintasa en la ruta de los leucotrienos, como la

proteína MyD88 presente en la ruta de la neuro inflamación producida en este trastorno progresivo (199). Por otro lado, en un estudio *in-vitro* fue sugerido que lumacaftor podría restaurar el tráfico y aumentar los niveles estables de proteína ABCA4 mutantes que causan la enfermedad de degeneración macular de Stargardt (200). Finalmente, en este estudio, está molécula realizó interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Leu78, Pro110, Glu112, His142, Cys165, Ile294, Lys310, Gln311, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520 e His522 y por puente de hidrógeno con DDZ79, Ser80 y Tyr108, como se puede observar en la imagen del anexo 6.

Palosuran en un antagonista no peptídico, competitivo y selectivo del receptor de la urotensina humana que fue evaluado en modelos experimentales de falla renal como potencial protector renal por sus efectos beneficiosos sobre el flujo sanguíneo renal, proteinuria y en el desarrollo de daño glomerular y túbulo intersticial. El primer estudio de prueba en humanos se realizó en pacientes hipertensos con nefropatía por diabetes mellitus tipo II, pero no hubo un cambio significativo frente a placebo en la excreción de albumina en orina y no se observaron efectos hemodinámicos renales significativos. Sin embargo, fue bien tolerado y no se reportaron eventos que llevaran a la descontinuación del medicamento (201). Palosuran realizó interacciones con Leu78, DDZ79, Ser80, Asn106, Tyr108, Pro110, Glu112, Ile113, Lys140, His142, Cys165, Phe167, His236, Lys310, Gln311, Phe418, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520, Ser521 e His522.

Telmisartán es un bloqueador de los receptores de angiotensina II usado en el tratamiento de la hipertensión arterial. Experimentos con animales han postulado que puede regular el metabolismo de la glucosa y los lípidos, mejorando la resistencia a la insulina. Con el reporte de un metaanálisis de 21 estudios clínicos aleatorizados incluyendo 1679 pacientes, se confirmó que disminuyó la presión sanguínea diastólica y el nivel de glucosa e insulina en sangre en ayunas, comparado con otros antagonistas del receptor de angiotensina II (202). En general, es bien tolerado con una baja incidencia de eventos adversos, solo o en combinación con amlodipino (203). Un estudio de seguridad, eficacia y farmacocinética en 61 niños con telmisartán y 16 con placebo, mostró que puede ser una terapia apropiada para el tratamiento de la hipertensión pediátrica, aunque se requieren estudios más extensos en pacientes menores de 12 años (204). En cuanto al acoplamiento molecular, este fármaco realizó interacciones de tipo hidrofóbico con los aminoácidos

Leu78, DDZ79, Tyr108, Pro110, Glu112, His142, His236, Ile294, Lys310, Gln311, Ile416, Phe418, Cys489, Cys518, Leu519, Trp520, Ser521 e His522. Los enlaces o interacciones de GALNS con este compuesto se observan en la Figura 14.

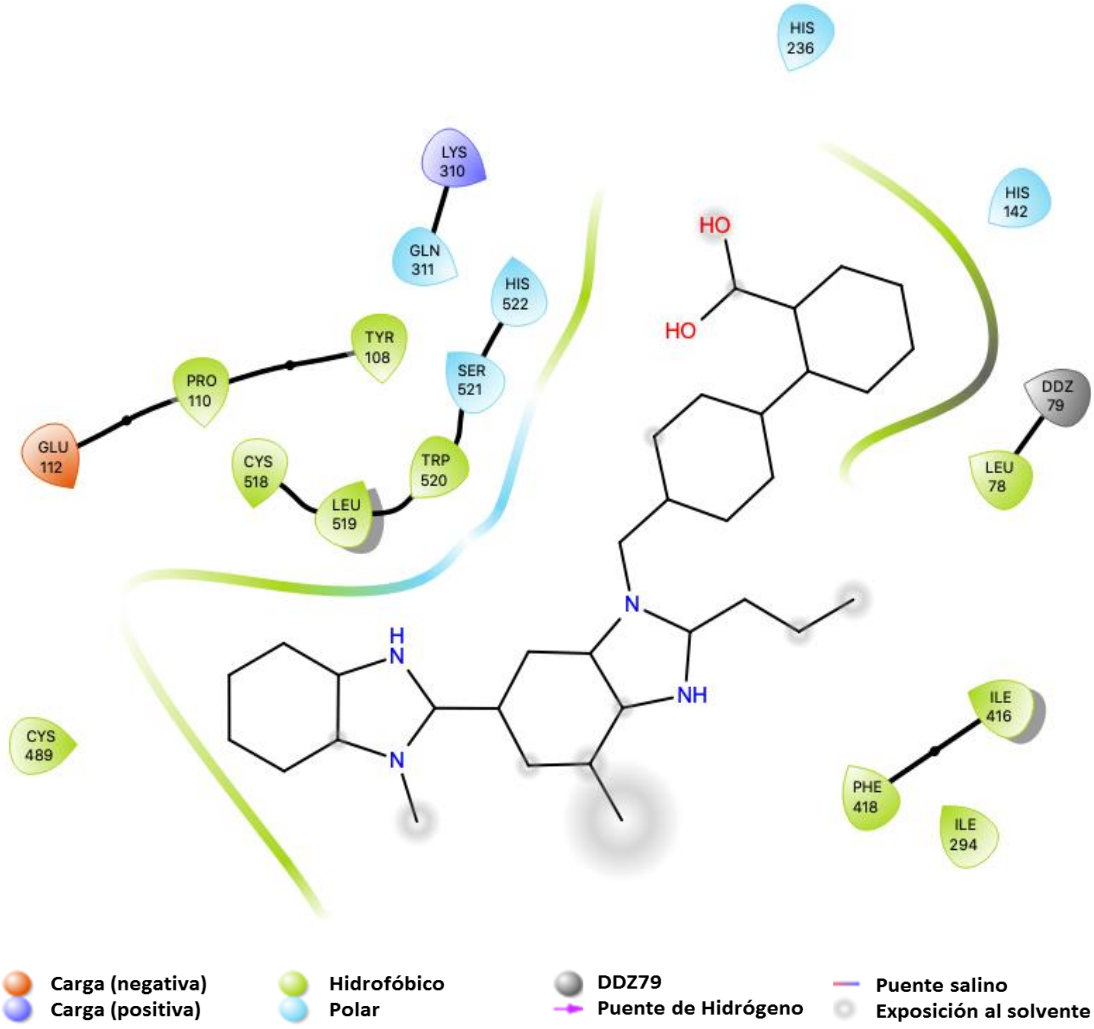


Figura 14: Acoplamiento molecular de GALNS con telmisartán.

Por otro lado, la dihidroergotoxina, dihidroergotamina y ergocristina son alcaloides ergotínicos que actúan a nivel del sistema nervioso, usados para el manejo de migraña, dolor de cabeza pediátrico refractario y terapia adjunta para pacientes con demencia vascular (183). El Comité de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Europea de Medicamentos recomendó restringir el uso de medicamentos que contengan derivados de ergot; estos ya no se deberían usar para tratar varias condiciones clínicas que involucran problemas de circulación sanguínea y problemas de memoria o para prevenir dolores de

cabeza por migraña, ya que los riesgos son mayores que los beneficios en estas indicaciones. Esto es basado en una revisión de datos clínicos que muestra un mayor riesgo de fibrosis y ergotismo (síntomas de intoxicación por ergot, como espasmos y circulación sanguínea obstruida) con estos medicamentos (205). Adicionalmente, ergocristina es un vasoconstrictor con un peso molecular mayor a los 600 Da y precursor químico utilizado en la fabricación ilícita de la dietilamida de ácido lisérgico o LSD (184), por lo tanto fueron descartados para continuar con el subsiguiente análisis computacional.

Los candidatos a CFs (ezetimiba y pranlukast), identificados previamente usando la estructura modelada de GALNS (162), al ser evaluados en este estudio mostraron valores de energía de afinidad que estuvieron entre -8.6 y -8.1 kcal/mol con la estructura cristalina, respectivamente. Estos resultados indican que los compuestos seleccionados por medio del tamizaje virtual al ser evaluados por acoplamiento molecular son más afines que las anteriores CFs descritas, así como, de los sustratos naturales (QS y C6S), lo cual es ideal para la búsqueda de posibles CFs, dado que en modelos *in-vitro* e *in-vivo*, la afinidad puede verse reducida con la presencia de otras proteínas y factores biológicos.

Teniendo en cuenta que los aminoácidos Leu78 y Tyr108 estuvieron presentes en la interacción con todas las moléculas identificadas en el tamizaje virtual, al ser evaluados en los tres programas computacionales y que en general también estuvieron presentes en todas las interacciones con los sustratos naturales y el artificial; este trabajo de investigación plantea la importancia de estos dos aminoácidos en el mecanismo catalítico de GALNS humana, siendo claves dentro de la cavidad activa. Contrario a lo planteado inicialmente, Ile416 y Phe418 (descritos con 4MUGPS y pranlukast) no estuvieron presentes en la interacción con todas las moléculas exógenas y se identificaron únicamente estableciendo una interacción hidrofóbica con telmisartán y tadalafilo, respectivamente. Es posible que los aminoácidos que varían interactuando con algunos compuestos y otros no, contribuyan a la selectividad por cada molécula.

Por último, como se observa en la Figura 15, estos compuestos presentan un acoplamiento similar al predicho para el sustrato natural QS (Figuras A, B y C) y con el sustrato artificial 4MUGPS (Figura D), mostrando que las moléculas identificadas podrían llegar a actuar como inhibidores competitivos dentro de la cavidad activa de GALNS.

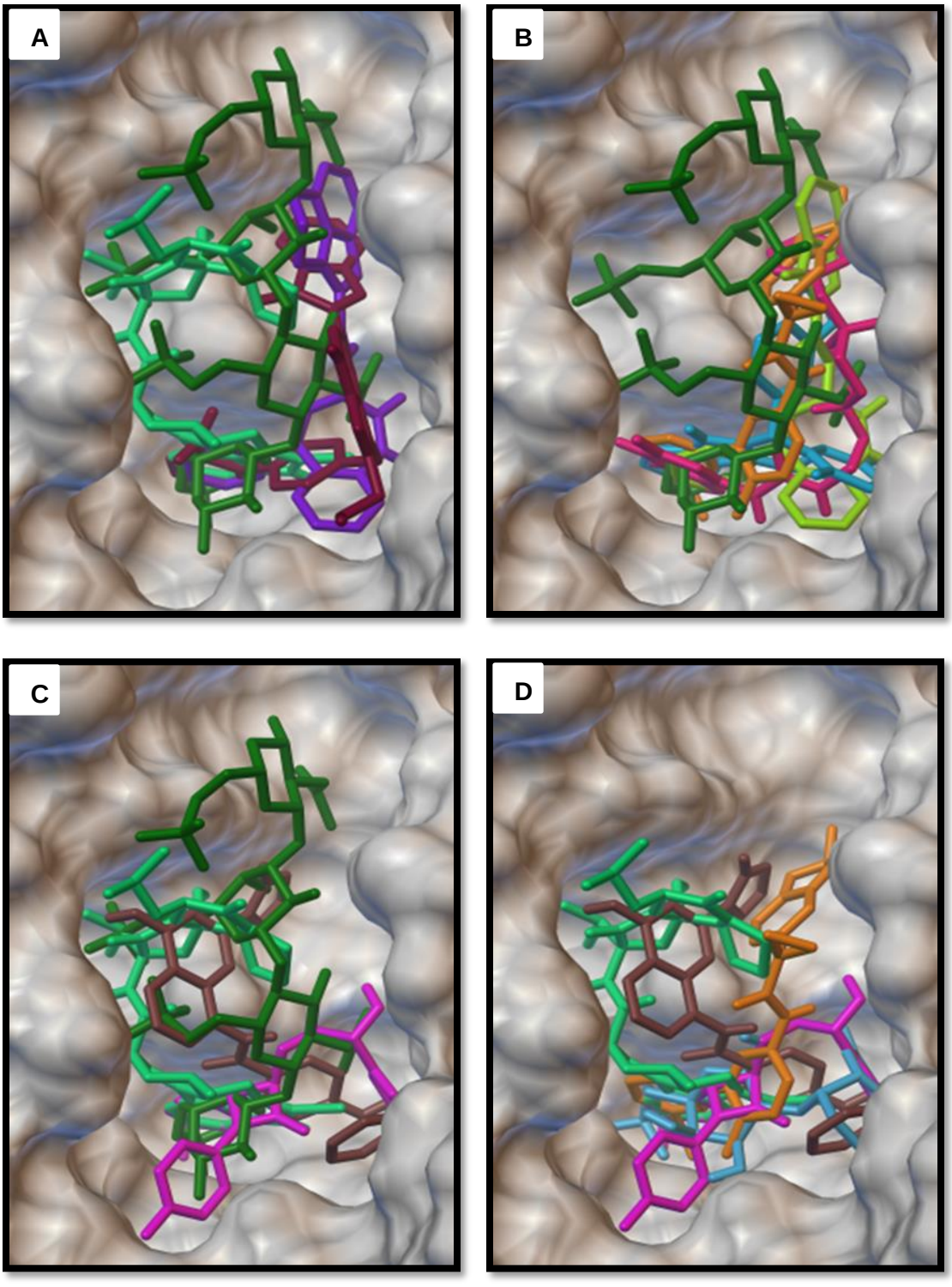


Figura 15: Comparación del acoplamiento entre el ligando QS comparado con las moléculas seleccionadas del ranking. A) QS: Verde; bromocriptina: Verde agua marina; tarazepida: Morado y Telmisartán: Vino tinto. B) QS: Verde; devazepida: Verde lima; 6R,12aS: Azul; Lumacaftor: Naranja; palosuran: Fucsia. C) Bromocriptina: Verde agua marina; ezetimiba: Violeta; pranlukast: Café. D) Comparación con 4MUGPS (Azul claro).

Estos resultados sugieren que las moléculas pequeñas evaluadas, se acoplan dentro del sitio activo convirtiéndose en potenciales chaperonas farmacológicas enfocadas hacia el desarrollo de un nuevo de tratamiento para la MPS IVA. En este sentido, una evaluación sobre células de pacientes MPS IVA mostró que la bromocriptina es un compuesto que presenta una actividad chaperona sobre la proteína GALNS, exponiendo un efecto dependiente de mutación (159), lo cual difiere de lo observado para ezetimiba quien mostró una actividad sobre un espectro más amplio de mutaciones (9).

De manera importante, en aquellos fibroblastos en los que la bromocriptina mostró un aumento de la actividad enzimática, se observó una reducción en la masa lisosomal, lo cual sugiere que, tras el tratamiento con el fármaco, habría un efecto sobre los niveles de sustrato acumulado (159). Además, la bromocriptina ha mostrado tener un buen perfil de seguridad en niños y adolescentes (206), representando una importante población de pacientes con MPS IVA.

Por último, además de la similitud estructural observada entre algunos compuestos evaluados (tarazepida vs devazepida), también se observaron similitudes funcionales entre algunas de las moléculas obtenidas en el tamizaje virtual, por ejemplo, moléculas que interactúan con la dopamina y receptores alfa-adrenérgicos (Clúster 1) o aquellos que comparten al receptor de mineralocorticoides como un objetivo potencial en común (Clúster 2), como se muestra en el anexo 7.

En resumen, estos hallazgos muestran que la estrategia empleada en este estudio permite identificar moléculas con potencial actividad de chaperona farmacológica de la enzima GALNS humana; preliminarmente muestran afinidad a nivel *in-silico* y podrían ser evaluadas en posteriores estudios con el fin de determinar su posible rol como CFs. Los resultados de este objetivo fueron presentados en el XI Latin American Congress of Inborn Errors of Metabolism and Neonatal Screening en modalidad de cartel (2019) y están incluidos en el artículo "*Bromocriptine as a novel pharmacological chaperone for mucopolysaccharidosis IV A*" publicado en la revista *ACS Medicinal Chemistry Letters* (IF 3.9, Scopus Q1) (159).

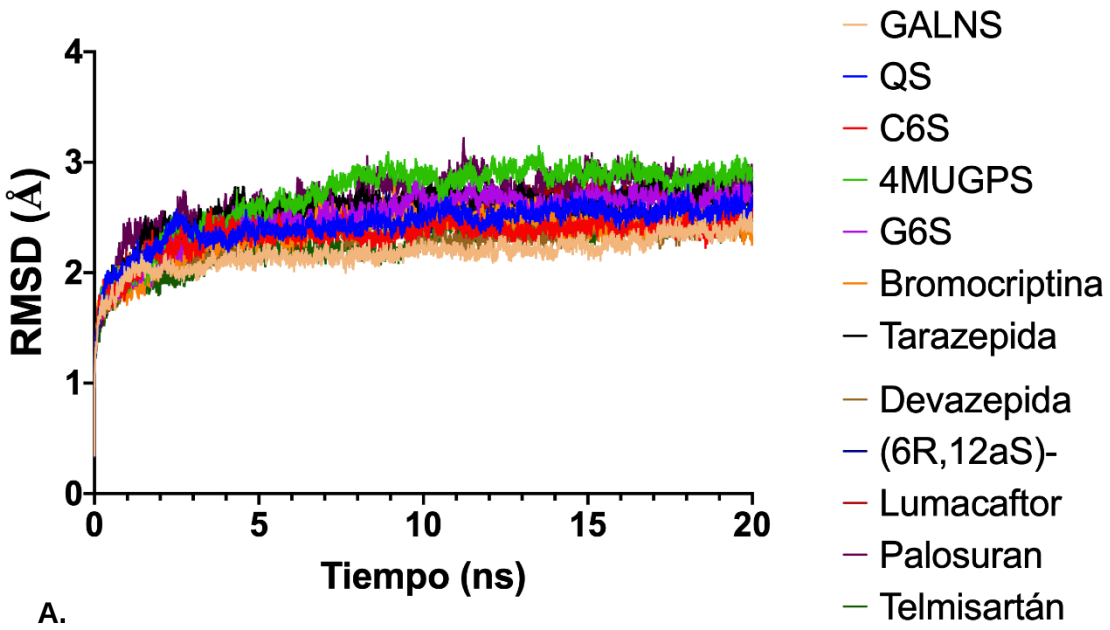
8.4 Dinámica molecular de GALNS con diversas moléculas pequeñas.

La estructura de la enzima GALNS con FGly y calcio como cofactor, iones y moléculas de agua dentro de un sistema equilibrado en temperatura y presión (Anexo 8 y 9) fueron evaluados por dinámica molecular. Se observó una tendencia similar en los 100 picosegundos (ps) de la etapa de equilibrio, la temperatura del sistema alcanzó rápidamente el valor objetivo (300 Kº) y permaneció estable durante el resto de la fase de equilibrio, siendo los valores promedio de presión cercanos a 1 bar; aunque la variación fluctúa ampliamente en el transcurso de la simulación, ese comportamiento es habitual en las simulaciones por dinámica molecular.

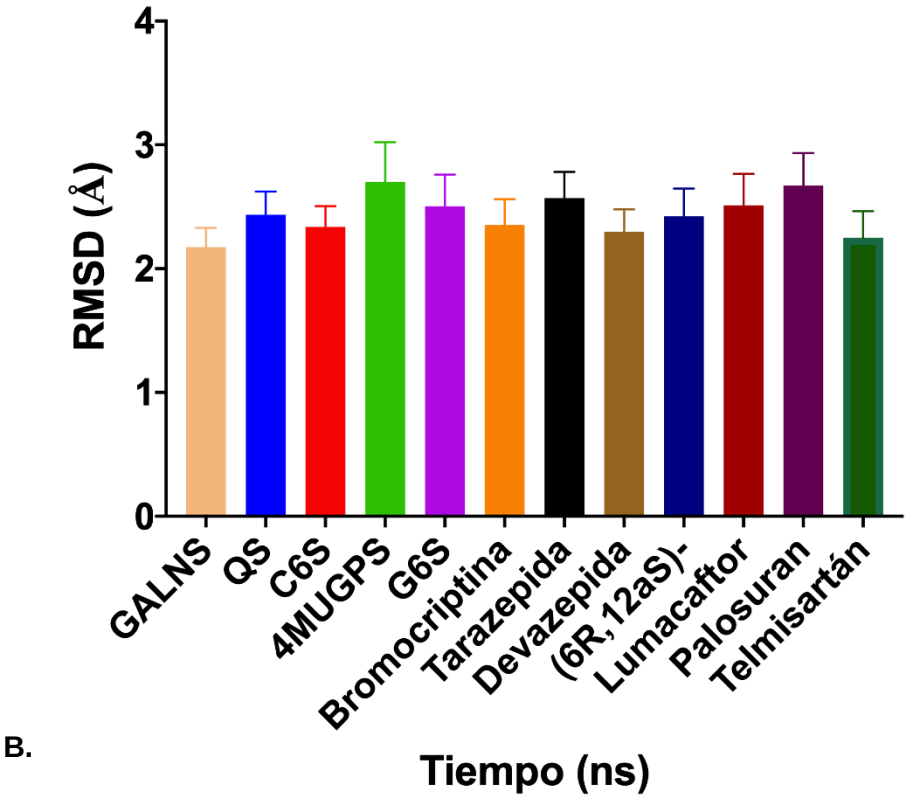
Fue analizado cada sustrato natural y candidato a CF dentro de la cavidad activa, con el fin de determinar la variación en la estructura de la proteína, así como las diferentes variaciones para los sustratos y moléculas estudiadas. Los resultados para las potenciales CFs seleccionadas del tamizaje virtual fueron evaluados en una simulación de 20 ns para establecer si su interacción con GALNS es estable en el tiempo. La cuantificación del cambio estructural, permite evaluar el estado de la proteína a lo largo de la trayectoria analizada mediante el RMSD de la estructura principal de la proteína, con las moléculas estudiadas en comparación a la estructura de referencia (207).

Como se observa en la Figuras 16 y 17, las moléculas identificadas en el tamizaje virtual se comportaron de manera muy similar a los sustratos naturales, se estabilizan rápidamente y sus trayectorias se mantienen generalmente estables durante el tiempo de simulación, soportando los resultados obtenidos por acoplamiento molecular computacional y demostrando que estas moléculas podrían llegar a interactuar con esta enzima lisosomal.

GALNS sola o con los sustratos alcanza los 2 Å de variación rápidamente (cerca a los 2 ns de simulación) y las diferencias de RMSD al final de los 20 ns, no superan los 0.53 Å para el sustrato artificial, donde hubo la mayor variación respecto a la enzima sola (sin sustratos) y para el C6S fue de solo 0.16 Å.

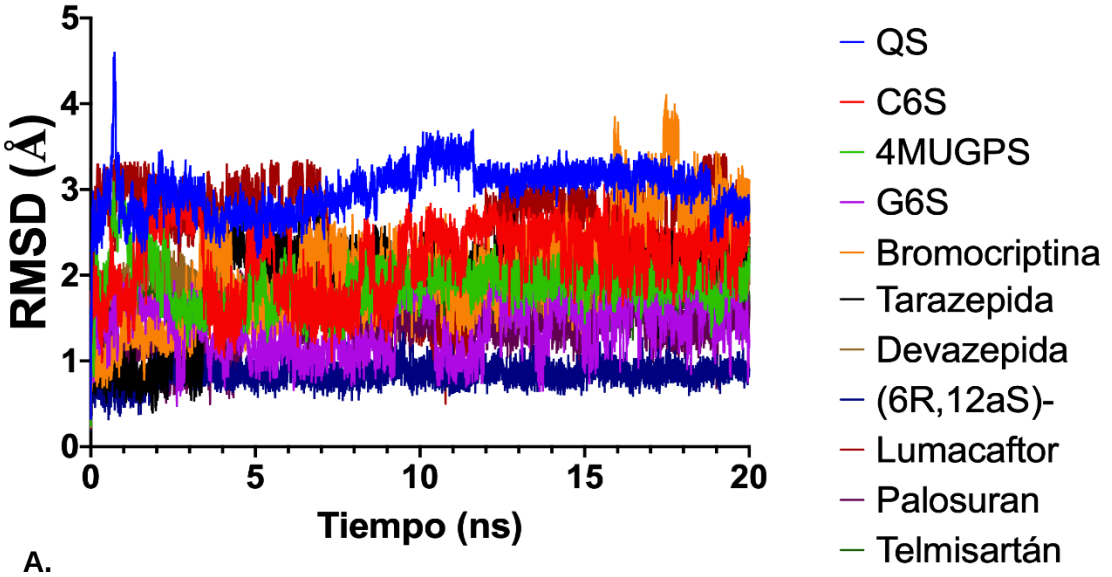


A.

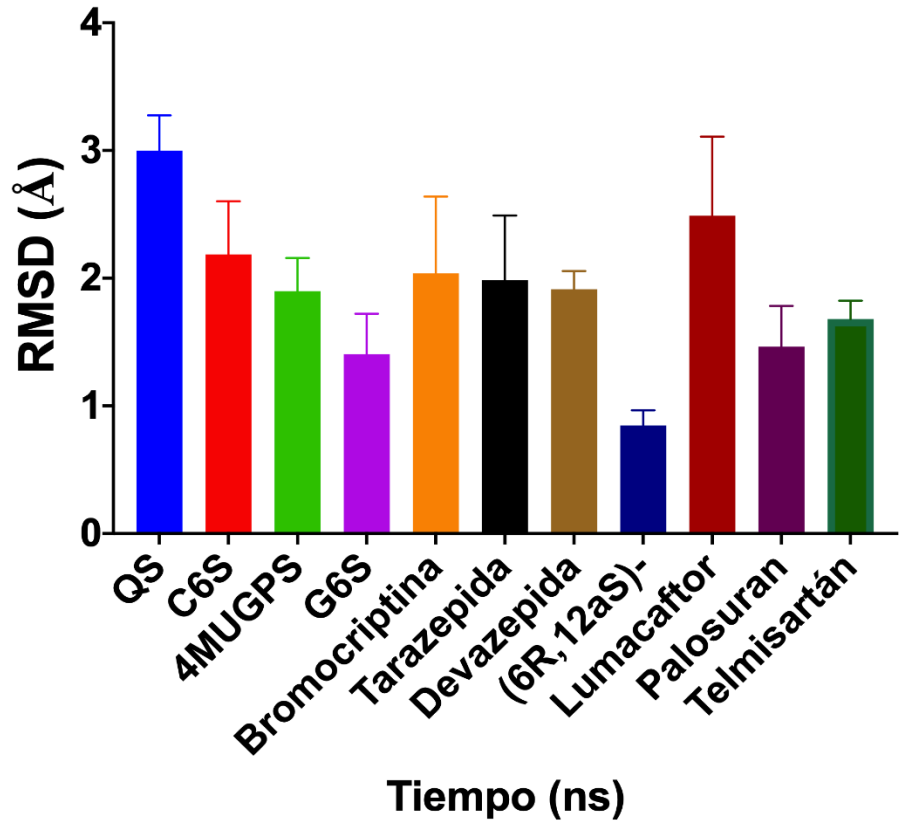


B.

Figura 16: Simulación por dinámica molecular de GALNS. A) Las trayectorias fueron analizadas por RMSD para la proteína acoplada con cada molécula. B) El promedio de RMSD para la proteína es representado en el gráfico de barras.



A.



B.

Figura 17: Simulación por dinámica molecular de GALNS con las moléculas evaluadas. A) Las trayectorias fueron analizadas por RMSD para cada ligando. B) El promedio del RMSD para la proteína con cada molécula es representado en el gráfico de barras.

El RMSD para la enzima GALNS sin sustratos fue de 2.17 Å ± 0.15, similar a la variación mostrada en la Figura 6 en una simulación de 100 ns para la evaluación por dinámica molecular de la enzima en un entorno equilibrado. Los valores de RMSD para la enzima con los sustratos naturales fueron: para QS 2.43 Å ± 0.18; C6S 2.33 Å ± 0.16; G6S 2.50 Å ± 0.25 y el artificial (4MUGPS) de 2.70 Å ± 0.32.

A su vez, los valores de RMSD para la proteína fueron muy similares cuando estuvieron presentes las moléculas pequeñas seleccionadas, al compararlos con los resultados obtenidos con la enzima sola o con los sustratos naturales. Para bromocriptina este valor fue de 2.35 Å ± 0.20; tarazepida 2.56 Å ± 0.21; devazepida 2.29 Å ± 0.17; tadalafilo 2.42 Å ± 0.22; lumacaftor 2.67 Å ± 0.26; palosuran 2.51 Å ± 0.25 y para telmisartán 2.24 Å ± 0.21. La proteína presenta la mayor variación estructural al interactuar con 4MUGPS, lumacaftor, tarazepida y palosuran; con valores mayores a los obtenidos con el sustrato QS y su monómero G6S. Los promedios de RMSD más pequeños fueron para telmisartán y devazepida con valores cercanos y un poco más bajos que el obtenido para C6S. Por último, el resultado para tadalafilo es muy similar con el de QS y el de bromocriptina con el sustrato natural C6S.

Para las moléculas, los valores promedios de RMSD al interactuar con GALNS en una simulación de dinámica molecular fueron los siguientes: QS de 2.99 Å ± 0.27; C6S 2.18 Å ± 0.41; G6S 1.40 Å ± 0.31 y 4MUGPS 1.89 Å ± 0.26. Por su parte, los promedios para las moléculas seleccionadas del tamizaje virtual fueron: bromocriptina 2.03 Å ± 0.60; tarazepida 1.98 Å ± 0.50; devazepida 1.91 Å ± 0.14; tadalafilo 0.84 Å ± 0.11; lumacaftor 2.48 Å ± 0.61; palosuran 1.46 Å ± 0.31 y telmisartán 1.68 Å ± 0.14. Estos resultados sugieren que la posición de ligandos fue estable durante el tiempo evaluado (20 ns), como se evidencia en la Figura 17. QS fue el sustrato con mayor variación estructural lo cual podría deberse al tamaño de este glicosaminoglicano y a posibles cambios conformacionales que debe sufrir dentro de la cavidad activa de GALNS; el promedio de RMSD es seguido de lumacaftor que presentó la mayor variación para las moléculas evaluadas como posibles CFs. Los valores de RMSD para tarazepida y devazepida fueron similares al del sustrato artificial 4MUGPS y el de bromocriptina con C6S. Los promedios de RMSD más pequeños fueron para la molécula tadalafilo, palosuran y telmisartán, con valores inferiores que los obtenidos para C6S y 4MUGPS. Por último, para G6S el

resultado de 1.40 Å ± 0.31 es un poco más alto que el obtenido con la estructura de GALNS reportado previamente el cual fue de 1.05 Å ± 0.17 (6).

La interacción de los complejos enzima – sustratos modelados muestran que GALNS tendría una mayor afinidad por el sustrato QS entre todos los evaluados (-120.9 ± 6.1 kJ/mol^{-1}), lo cual es esperado por ser su sustrato natural. Es seguido por telmisartán (-111.0 ± 7.7 kJ/mol^{-1}), tadalafilo (-109.6 ± 10.7 kJ/mol^{-1}) y devazepida (-89.3 ± 8.7 kJ/mol^{-1}). Las energías de unión para bromocriptina, tarazepida, lumacaftor y palosuran presentaron valores muy cercanos entre ellos (-44.9 ± 2.8 a -48.1 ± 3.5 kJ/mol-1), que a su vez son muy similares al reportado para 4MUGPS (-46.3 ± 2.7 kJ/mol^{-1}) y con valores cercanos, pero un poco más altos que para el C6S (-53.4 ± 2.6 kJ/mol^{-1}).

Para los sustratos naturales y el artificial los valores obtenidos se correlacionan más con los valores de energía de afinidad obtenidos por acoplamiento molecular, donde el más afín fue QS, seguido de C6S, 4MUGPS y G6S, como también se observa en la Figura 18 por resultados de dinámica molecular. Esto no se observó con las moléculas evaluadas, donde el más afín fue telmisartán, que estuvo ubicado en la posición 19 del ranking con una energía de afinidad de -9.8 kcal/mol y está también se asoció con el RMSD más bajo de la proteína al interactuar en una simulación de 20 ns.

Con el fin de comparar los candidatos descritos en este estudio versus las dos moléculas previamente reportadas como posibles CFs para GALNS, se realizó la misma simulación de dinámica molecular de 20 ns para ezetimiba y pranlukast, obteniéndose resultados de RMSD para GALNS de 0.23 Å ± 0.01 y 0.23 Å ± 0.02 de variación, así como, 0.14 ± 0.03 y 0.28 ± 0.05, respectivamente para ezetimiba y pranlukast. Lo cual muestra que no hay variaciones significativas y las interacciones podrían ser estables en el tiempo.

Estos valores son los más bajos obtenidos para todas las moléculas estudiadas en este estudio incluyendo los sustratos naturales, lo cual puede deberse a que estos compuestos podrían aumentar la estabilidad estructural de GALNS sin generar cambios conformacionales como si lo hiciesen QS y C6S.

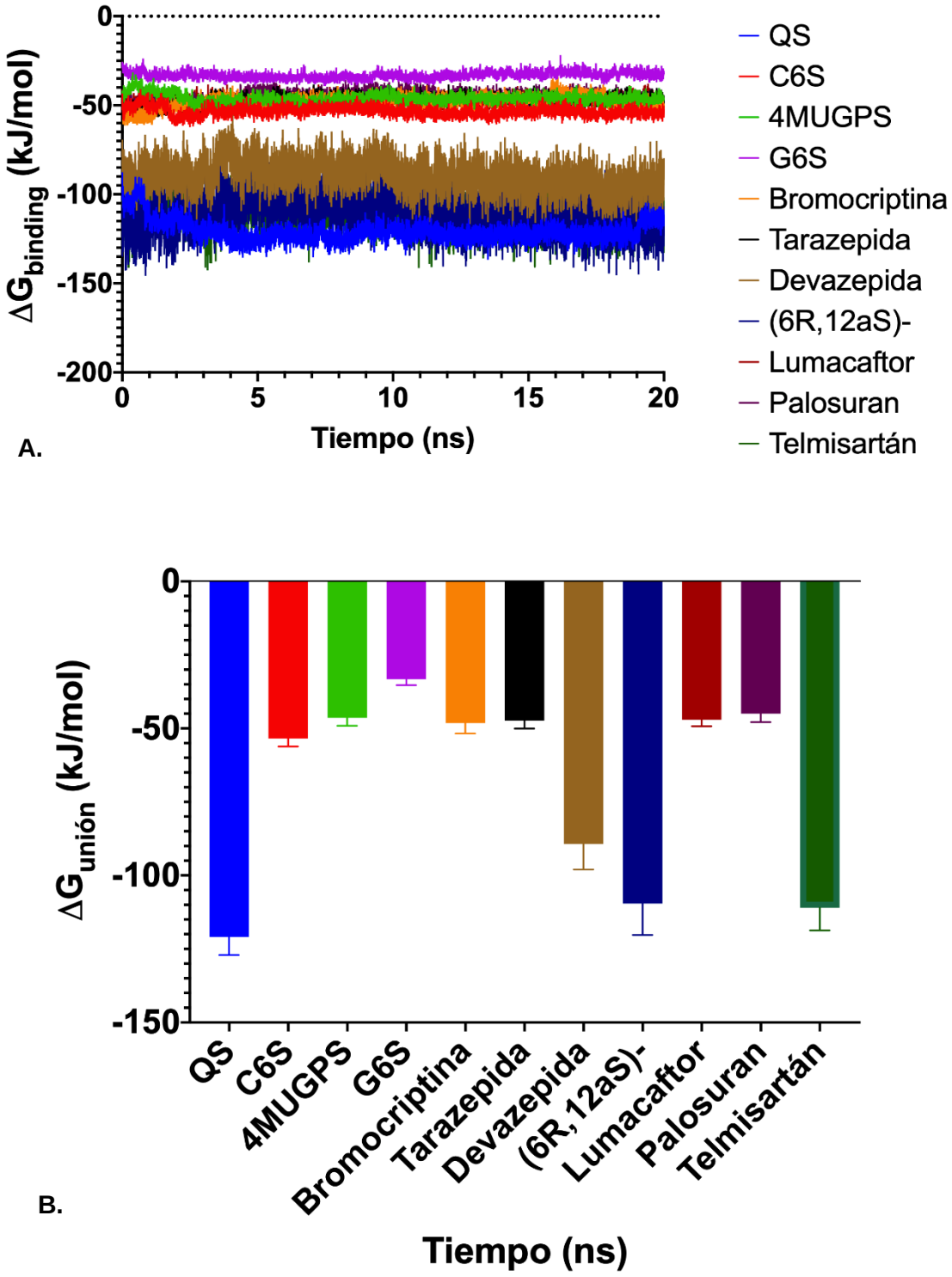


Figura 18: Simulación por dinámica molecular de GALNS. A) Las variaciones en la energía de unión fueron analizadas para la proteína acoplada con cada molécula. B) El promedio de la energía de unión es representado en el gráfico de barras.

Otro resultado interesante se obtuvo con los valores de energía de unión, donde ezetimiba reportó el valor promedio más bajo entre todas las simulaciones realizadas (-172.9 ± 19.3 kJ/mol^{-1}) el cual es más bajo que para QS y telmisartán, justificando los resultados que se han obtenido a nivel *in-vitro*. Por su parte, para pranlukast es reportado un valor de (-57.8 ± 3.7 kJ/mol^{-1}), más cercano al resultado obtenido para bromocriptina y un poco menor que el reportado para C6S. Estos resultados son resumidos en la tabla del anexo 9.

En ese sentido, los valores obtenidos para devazepida, tadalafilo y telmisartán podrían sugerir que estas moléculas pueden ser afines, al igual que los principales candidatos ya reportados como potenciales chaperona farmacológicas (ezetimiba y pranlukast) posterior a la evaluación *in-silico* e *in-vitro* (9). Aunque, hasta el momento no se ha identificado una correlación entre esos valores de energía y la inhibición enzimática sobre GALNS (159). Por lo que adicional a bromocriptina, que presenta valores muy cercanos al del sustrato natural C6S en los parámetros evaluados en esta simulación de dinámica molecular y que fue el líder del tamizaje virtual, este trabajo reporta otros candidatos que deberían ser evaluados a nivel *in-vitro*, especialmente tadalafilo y telmisartán que presentan valores de energía de unión más cercanos a QS y con valores de RMSD bajos, comparados con los de las otras moléculas evaluadas, especialmente para las trayectorias analizadas por RMSD para cada molécula, como se observa en la Figura 17.

En el caso de bromocriptina hay un incremento en el RMSD a 3.10 Å al final de la simulación de 20 ns, con un valor mayor al del resto de moléculas incluyendo el QS. En una evaluación adicional, se realizó una dinámica molecular de 100 ns para sustratos naturales, artificial y bromocriptina (Figura 19). Las simulaciones predijeron unos valores de RMSD significativamente más altos para GALNS, cuando está acoplada con los sustratos naturales (QS, C6S y G6S) que, con la proteína libre, sugiriendo que la interacción enzima – sustrato puede inducir un cambio estructural sobre la proteína. Sin embargo, estos valores no fueron significativamente diferentes entre los sustratos evaluados ($p > 0.05$), como se observa en la Figura 19 (A-B). En esta simulación también se pudo observar que bromocriptina podría inducir un cambio estructural en GALNS similar al generado con los sustratos naturales. Por otro lado, a diferencia de la simulación de 20 ns, la variación en RMSD para la proteína junto al sustrato artificial 4MUGPS fue cercana al valor de referencia con GALNS libre en la simulación.

También se pudo observar que los sustratos y la bromocriptina al ser evaluadas a 100 ns, estuvieron estables dentro de la cavidad activa durante todo el tiempo de la simulación, como se observa en la Figura 19 (C-D). La mayor variación en el RMSD fue para QS con un promedio superior a los 3 Å, lo cual fue también observado en la simulación a 20 ns. Al aumentar la duración de la simulación, la variación de bromocriptina fue menor con un promedio de RMSD menor a 2 Å y siendo más estable la interacción. Así mismo, para bromocriptina se obtuvo un promedio en la energía de unión de (-65.6 ± 3.65 kJ/mol-1), que es más alto que el valor obtenido para QS (-120.5 ± 5.5 kJ/mol-1), con una diferencia estadísticamente significativa como se muestra en la Figura 19F.

Esto sugiere que bromocriptina posiblemente no competiría con el sustrato natural en la cavidad activa de GALNS dentro del lisosoma y complementa los resultados del acoplamiento molecular computacional, mostrando que esta enzima lisosomal no es más afín por esta molécula que por el sustrato natural. Los valores de energía de unión fueron para C6S (-52,4 ± 2,8 kJ/mol^{-1}), 4MUGPS (-46,9.5 ± 3,7 kJ/mol^{-1}) y G6S (-37,9 ± 2,9 kJ/mol^{-1}) representados en la Figura 19 (E-F), los cuales son muy cercanos a los valores obtenidos en la primera simulación de 20 ns y estos resultados se correlacionan con los obtenidos por acoplamiento molecular donde GALNS es más afín por el QS, seguido de C6S, 4MUGPS y G6S; para los valores de energía de afinidad obtenidos por AutoDock Vina y en la simulaciones de dinámica molecular en Gromacs.

Resultados previos de la caracterización experimental de bromocriptina, lo convierten preliminarmente en un nuevo candidato a chaperona farmacológica para la MPS IVA. El ensayo inhibitorio *in vitro* mostró que reduce la actividad de GALNS hasta en un 30%. Por su parte, la actividad de la enzima recombinante producida en las células HEK293 aumentó hasta 1.48 veces. Adicional a esto, incrementó la actividad de GALNS en fibroblastos MPS IVA y redujo la masa lisosomal de una manera dependiente de la mutación (159).

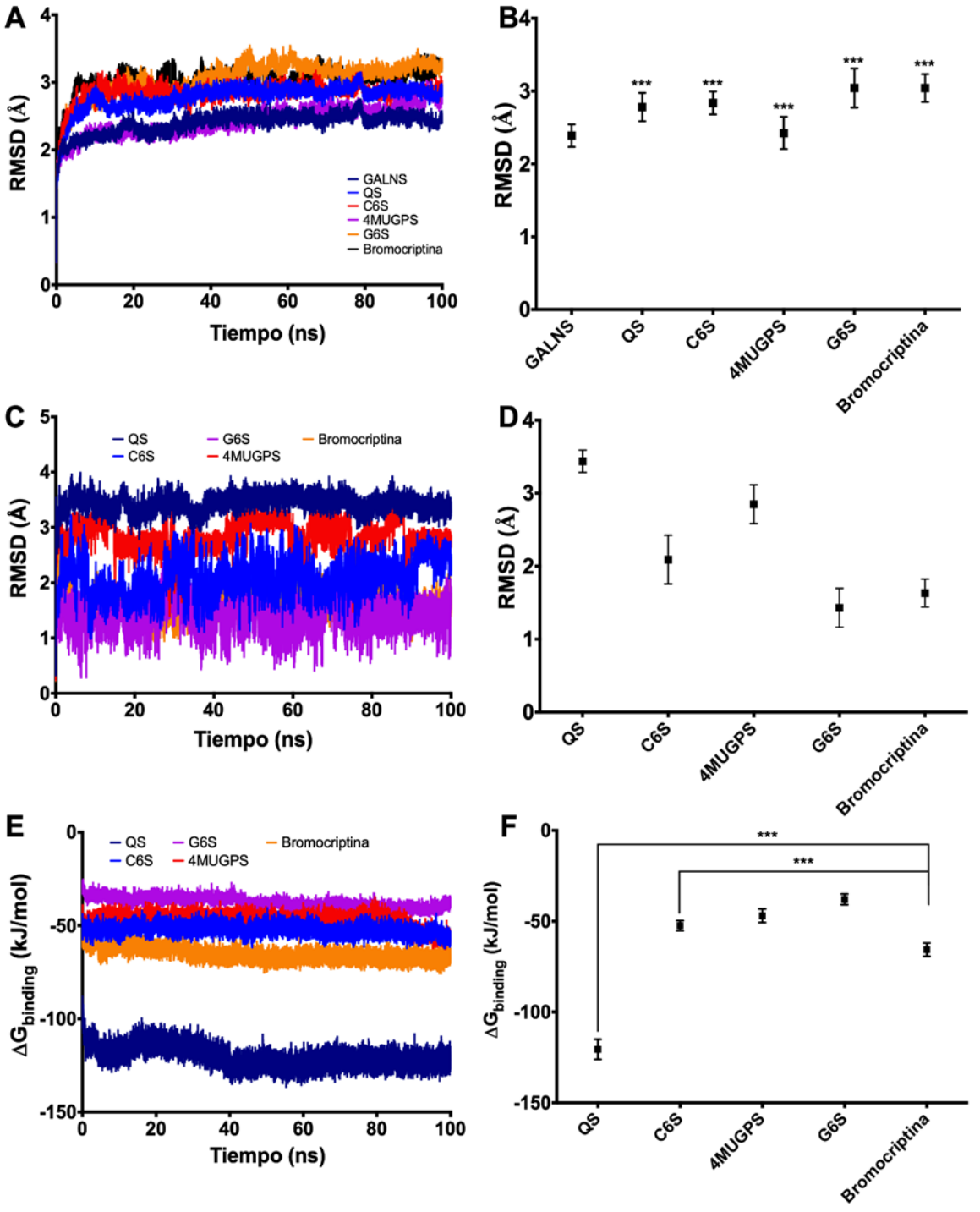


Figura 19: Simulación por dinámica molecular de GALNS. Las trayectorias fueron analizadas por RMSD para la proteína acoplada con cada molécula (A), para cada ligando (C) y por energía de afinidad (E). El promedio del RMSD para la proteína acoplada con cada molécula (B), para el ligando (D) y promedio de la energía de afinidad (F). (ANOVA Holm-Šidák test *** $p < 0.0001$, n=50001).

Por otro lado, telmisartán que es un bloqueador del receptor de la angiotensina y tadalafilo como un inhibidor de la fosfodiesterasa 5, presentan la ventaja que hacen parte de grupos de fármacos ampliamente conocidos, con información clínica en población pediátrica y un perfil de seguridad establecido, lo cual los postula junto a bromocriptina en candidatos potenciales para continuar su evaluación *in-vitro*, con el fin de determinar si pueden actuar como CFs de GALNS y que ese efecto se traslade en un beneficio clínico con el incremento de la actividad enzimática, reducción del sustrato o potencializar y mejorar la eficacia de la actual estrategia de TRE.

Sin embargo, evaluar más moléculas fuera del ranking de las 20 seleccionadas en este estudio y realizar nuevos tamizajes virtuales con otras librerías de compuestos, deberían ser desarrollados para ampliar el número de posibles chaperonas farmacológicas para GALNS, seguidos por procesos de modificación y optimización de las estructuras, buscando mejorar aún más la afinidad de la enzima y posteriormente analizar estos candidatos a nivel *in-vitro* e *in-vivo*. En resumen, estos resultados soportan los obtenidos por acoplamiento molecular computacional y se sugiere que este tipo de evaluación por dinámica molecular puede ser útil para evaluar moléculas candidatas a CFs para GALNS humana y que en posteriores estudios esta estrategia podría ser utilizada para analizar el efecto sobre la interacción, cambios de trayectoria, estabilidad y valores de energía de unión con estructuras de la proteína mutada.

Parte de los resultados de este objetivo fueron publicados en el artículo "*Bromocriptine as a novel pharmacological chaperone for mucopolysaccharidosis IVA*" publicado en la revista *ACS Medicinal Chemistry Letters* (IF 3.9, Scopus Q1 (159).

9 Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo a lo reportado previamente, este es el primer estudio en evaluar el acoplamiento molecular de GALNS con diferentes sustratos usando la estructura cristalina con el aminoácido modificado formilglicina, permitiendo confirmar los aminoácidos claves en la interacción con sus sustratos naturales y artificial como son FGly79, Tyr108, His142, Ile294, Lys310, Gln311 y Ser521, para algunos sustratos también podrían interactuar los residuos Leu78, Asn106, Lys140, His236 y Trp520, siendo estos últimos los residuos que interactúan con la cadena de carbono de los sustratos y quienes podrían contribuir a definir la especificidad por el sustrato. A su vez, se confirmó que GALNS es mucho más afín por su sustrato natural que por el artificial y que lo es más por QS que por C6S (-8.4 vs -7.8 kcal/mol, respectivamente), hallazgos que también fueron validados por dinámica molecular, con los resultados de la energía libre de unión donde QS mostró el menor valor, ratificando la conclusión obtenida por acoplamiento molecular computacional.

Está estrategia de tamizaje virtual permitió identificar candidatos que podrían ser evaluados como potenciales chaperonas farmacológicas para GALNS, de las cuales los primeros compuestos presentan un valor de energía de afinidad menor a los -10 kcal/mol, mostrando a nivel *in-silico* ser afines por GALNS humana y acoplarse dentro de la cavidad activa de una manera altamente similar a los sustratos naturales, realizando interacciones con los aminoácidos claves en el mecanismo catalítico de esta sulfatasa, aunque otros tipos de interacciones deben ser contempladas en futuras evaluaciones. A su vez estas moléculas podrían ser utilizadas como modelo para la búsqueda de nuevos candidatos que puedan ser evaluados como posibles CFs, aunque la estrategia de tamizaje con la base de datos utilizada en este estudio presenta un gran ventaja y es que permitió encontrar fármacos que ya tienen información preclínica reportada y algunos con información de eficacia y seguridad de estudios clínicos y de la etapa de post comercialización, lo que ayudaría a disminuir el tiempo de desarrollo de una potencial CF para la enzima GALNS humana.

Los resultados de dinámica molecular permitieron evidenciar que la interacción de GALNS con los sustratos naturales, artificial y las moléculas seleccionadas del ranking del tamizaje virtual son estables en una evaluación de 20 ns y las trayectorias se comportaron de manera similar a C6S, G6S y al sustrato artificial. Bromocriptina al ser evaluado en este estudio computacional tuvo unos resultados similares a C6S, en los resultados de dinámica molecular a 20 ns y fue estable en su interacción con GALNS a 100 ns. En general, estos resultados contribuyen a la consolidación de bromocriptina como una posible chaperona farmacológica y una terapia emergente para esta enfermedad. Adicional se postula que tadalafilo y telmisartán tiene el mayor potencial *in-silico* para seguir siendo evaluadas como posibles CFs de GALNS humana.

Mayores estudios deben ser realizados para establecer si una potencial CF podría promover algún incremento en la estabilidad de la enzima, que le permita ser funcional a GALNS con mutaciones asociadas con un fenotipo severo o atenuado, lo cual tenga algún impacto sobre la degradación del sustrato acumulado y/o reestableciendo procesos metabólicos alterados en esta enfermedad. Adicionalmente, nuevos tamizajes virtuales podrían ser desarrollados con otras librerías de compuestos disponibles en ZINC como la de moléculas naturales, para ampliar el número de posibles chaperonas farmacológicas. Procesos de modificación y optimización de estos compuestos, buscando mejorar aún más la afinidad de la enzima deben ser ahora contempladas y la estrategia usada en este estudio puede extrapolarse a la búsqueda de posibles CFs en otras enfermedades de depósito lisosomal y mucopolisacaridosis.

Este estudio reporta nuevos compuestos con potencial para ser usados como CF para la enzima lisosomal GALNS humana y estudiar estos compuestos a nivel *in-vitro* es necesario para determinar el verdadero potencial de estos fármacos para ser usados como una interesante estrategia terapéutica, que pueda mejorar los resultados clínicos del tratamiento y que sea una opción costo – efectiva para el manejo de este síndrome que, en Colombia, tiene un importante impacto social, económico y médico. Para terminar, la evaluación *in-silico* de GALNS permitió identificar nuevos candidatos, expandiendo el estudio y búsqueda de CFs como una terapia alternativa para la MPS IVA.

10 Bibliografía

1. Tomatsu S, Montano AM, Oikawa H, Smith M, Barrera L, Chinen Y, et al. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment. Curr Pharm Biotechnol. 2011;12(6):931-45. Epub 2011/04/22.
2. Tomatsu S, Montano AM, Lopez P, Trandafirescu G, Gutierrez MA, Oikawa H, et al. Determinant factors of spectrum of missense variants in mucopolysaccharidosis IVA gene. Mol Genet Metab. 2006;89(1-2):139-49. Epub 2006/07/14.
3. Sawamoto K, Alméciga-Díaz CJ, Mason RW, Orii T, Tomatsu S. Mucopolysaccharidosis type IVA: clinical features, biochemistry, diagnosis, genetics, and treatment. In: Tomatsu S, Lavery C, Giugliani R, Harmatz P, Scarpa M, Węgrzyn G, et al., editors. Mucopolysaccharidoses update (2 volume set). Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Inc.; 2018. p. 235-72.
4. Sawamoto K, Stapleton M, Almeciga-Diaz CJ, Espejo-Mojica AJ, Losada JC, Suarez DA, et al. Therapeutic Options for Mucopolysaccharidoses: Current and Emerging Treatments. Drugs. 2019;79(10):1103-34. Epub 2019/06/19.
5. Parenti G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. EMBO Mol Med. 2009;1(5):268-79. Epub 2010/01/06.
6. Olarte-Avellaneda S, Rodriguez-Lopez A, Almeciga-Diaz CJ, Barrera LA. Computational analysis of human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase enzyme: an update in genotype-phenotype correlation for Morquio A. Mol Biol Rep. 2014;41(11):7073-88. Epub 2014/10/08.
7. Rivera-Colon Y, Schutsky EK, Kita AZ, Garman SC. The Structure of Human GALNS Reveals the Molecular Basis for Mucopolysaccharidosis IV A. J Mol Biol. 2012. Epub 2012/09/04.
8. Olarte-Avellaneda S, Rodríguez-López A, Alméciga-Díaz CJ. In-silico analysis of the active cavity of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in eight species. In: Castillo LF, Cristancho M, Isaza G, Pinzón A, Corchado JM, editors. Advances in Computational Biology: Springer International Publishing; 2014. p. 141-6.
9. Almeciga-Diaz CJ, Hidalgo OA, Olarte-Avellaneda S, Rodriguez-Lopez A, Guzman E, Garzon R, et al. Identification of ezetimibe and pranlukast as pharmacological chaperones for treatment of the rare disease Mucopolysaccharidosis type IVA. J Med Chem. 2019. Epub 2019/06/13.
10. Losada Díaz JC, Cepeda del Castillo J, Rodriguez-López EA, Alméciga-Díaz CJ. Advances in the development of pharmacological chaperones for the mucopolysaccharidoses. Int J Mol Sci. 2020;21(1):232.

11. Montano AM, Tomatsu S, Gottesman GS, Smith M, Orii T. International Morquio A Registry: clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. J Inherit Metab Dis. 2007;30(2):165-74. Epub 2007/03/10.
12. Tomatsu S, Montano AM, Nishioka T, Gutierrez MA, Pena OM, Tranda Firescu GG, et al. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). Hum Mutat. 2005;26(6):500-12. Epub 2005/11/16.
13. ADRES. Análisis de los recobros correspondientes al principio activo elosulfasa alfa (Vimizim) para las vigencias 2016 y 2017. Medicamento para el síndrome de Morquio tipo A. . https://wwwadresgovco/Portals/0/Noticias/Publicaciones/Vimizimpdf?ver=2018-04-26-091843-653. 2018:17.
14. Hou ZS, Ulloa-Aguirre A, Tao YX. Pharmacoperone drugs: targeting misfolded proteins causing lysosomal storage-, ion channels-, and G protein-coupled receptors-associated conformational disorders. Expert Rev Clin Pharmacol. 2018;11(6):611-24. Epub 2018/06/01.
15. Pereira DM, Valentao P, Andrade PB. Tuning protein folding in lysosomal storage diseases: the chemistry behind pharmacological chaperones. Chem Sci. 2018;9(7):1740-52. Epub 2018/05/03.
16. Leidenheimer NJ. Pharmacological chaperones: Beyond conformational disorders. Handb Exp Pharmacol. 2018;245:135-53.
17. Tao YX, Conn PM. Pharmacoperones as novel therapeutics for diverse protein conformational diseases. Physiol Rev. 2018;98(2):697-725.
18. Beck M. Treatment strategies for lysosomal storage disorders. Dev Med Child Neurol. 2018;60(1):13-8. Epub 2017/11/02.
19. Colombia-Congreso-de-la-República. LEY 1392 DE 2010. 2010.
20. Alméciga-Díaz CJ, Suárez AMM, Tomatsu S, A. LAB. Contribución colombiana al conocimiento de la enfermedad de Morquio A IMBIOMED. 2012;34(3):221-41.
21. Puentes-Tellez MA, Lerma-Barbosa PA, Garzon-Jaramillo RG, Suarez DA, Espejo-Mojica AJ, Guevara JM, et al. A perspective on research, diagnosis, and management of lysosomal storage disorders in Colombia. Heliyon. 2020;6(3):e03635. Epub 2020/04/08.
22. Tapiero-Rodriguez SM, Acosta Guio JC, Porras-Hurtado GL, Garcia N, Solano M, Pachajoa H, et al. Determination of genotypic and clinical characteristics of Colombian patients with mucopolysaccharidosis IVA. The application of clinical genetics. 2018;11:45-57. Epub 2018/05/08.
23. Moreno GLJ, Escudero RAM, Sanchez GA, Satizabal SJM. Clinical and molecular characteristics of colombian patients with mucopolysaccharidosis IVA, and description of a new galns gene mutation. Mol Genet Metab Rep. 2018;16:53-6. Epub 2018/08/11.
24. Gómez A, Robles R, Suárez-Obando F. Estimation of the mucopolysaccharidoses frequencies and cluster analysis in the Colombian provinces of Cundinamarca and Boyacá. Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud. 2012;32:602-9.

25. Leadley RM, Lang S, Misso K, Bekkering T, Ross J, Akiyama T, et al. A systematic review of the prevalence of Morquio A syndrome: challenges for study reporting in rare diseases. Orphanet J Rare Dis. 2014;9:173. Epub 2014/11/19.
26. Bernal J, Briceño I. Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco-La Tolita culture in Colombia–Ecuador. Clin Genet. 2006;70:188-91.
27. Pachajoa H, Rodriguez CA, Isaza C. Possible case of Morquio syndrome in the pottery of Tumaco-Tolita culture. Rev Neurol. 2009;48(1):52. Epub 2009/01/16. Posible caso de sindrome de Morquio en la ceramica de la cultura tumaco-tolita.
28. Tomatsu S, Sawamoto K, Shimada T, Bober MB, Kubaski F, Yasuda E, et al. Enzyme replacement therapy for treating mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A syndrome): effect and limitations. Expert Opin Orphan Drugs. 2015;3(11):1279-90.
29. Sáenz H, Lareo L, Poutou RA, Sosa AC, Barrera LA. Predicción computacional de la estructura terciaria de la iduronato 2-sulfato sulfatasa. Biomedica. 2007;27(001):7-20.
30. Echeverri OY, Guevara JM, Espejo-Mojica AJ, Ardila A, Pulido N, Reyes M, et al. Research, diagnosis and education in inborn errors of metabolism in Colombia: 20 years' experience from a reference center. Orphanet J Rare Dis. 2018;13(1):141. Epub 2018/08/18.
31. Rodriguez A, Espejo AJ, Hernandez A, Velasquez OL, Lizaraso LM, Cordoba HA, et al. Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in Escherichia coli BL21. J Ind Microbiol Biotechnol. 2010;37(11):1193-201. Epub 2010/06/29.
32. Mosquera A, Rodríguez A, Soto C, Leonardi F, Espejo A, Sánchez OF, et al. Characterization of a recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in E. coli for enzyme replacement therapy of Morquio A disease. Process Biochemistry. 2012:1-6.
33. Hernandez A, Velasquez O, Leonardi F, Soto C, Rodriguez A, Lizaraso L, et al. Effect of Culture Conditions and Signal Peptide on Production of Human Recombinant N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase in Escherichia coli BL21. J Microbiol Biotechnol. 2013;23(5):689-98. Epub 2013/05/08.
34. Reyes LH, Cardona C, Pimentel L, Rodriguez-Lopez A, Almeciga-Diaz CJ. Improvement in the production of the human recombinant enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (rhGALNS) in Escherichia coli using synthetic biology approaches. Scientific reports. 2017;7(1):5844. Epub 2017/07/21.
35. Rodriguez-Lopez A, Almeciga-Diaz CJ, Sanchez J, Moreno J, Beltran L, Diaz D, et al. Recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) produced in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Sci Rep. 2016;6:29329. Epub 2016/07/06.
36. Alméciga-Diaz CJ, A. R-PM, Echeverri OY, Montaño AM, Tomatsu S, Barrera LA. Uso de vectores derivados de virus adenoasociados para el tratamiento de la enfermedad de Morquio A. Univ Med. 2009;50(3):356-79.
37. Almeciga-Diaz CJ, Montano AM, Tomatsu S, Barrera LA. Adeno-associated virus gene transfer in Morquio A disease - effect of promoters and sulfatase-modifying factor 1. FEBS J. 2010;277(17):3608-19. Epub 2010/08/19.

38. Almeciga-Diaz CJ, Rueda-Paramo MA, Espejo AJ, Echeverri OY, Montano A, Tomatsu S, et al. Effect of elongation factor 1alpha promoter and SUMF1 over in vitro expression of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. Mol Biol Rep. 2009;36(7):1863-70. Epub 2008/11/08.
39. Gutierrez MA, Vallejo F, Tomatsu S, Cerón F, Almeciga-Diaz CJ, Dominguez MC, et al. Construcción de un vector de expresión derivado de virus adenoasociados para corregir In vitro el defecto genético de la enfermedad de Morquio A. Biomedica. 2008;28(003):448-59.
40. Almeciga C, Cuaspa R, Herrera J, Barbosa H, Barrera L. New viral vectors for Morquio syndrome type A gene therapy. Molecular Genetics and Metabolism. 2013;108(2):19.
41. Alméciga-Díaz CJ MA, Barrera LA., Tomatsu S. . Tailoring the AAV2 capsid vector for bone-targeting. . Pediatr Res 2018.
42. Alméciga-Diaz CJ, Barrera LA. Design and applications of gene therapy vectors for mucopolysaccharidosis in Colombia. Gene Therapy. 2019.
43. Alméciga-Diaz C, Alexander R. A system biology view of the glycosaminoglycans degradation pathways. Molecular Genetics and Metabolism. 2012.
44. Salazar DA, Rodriguez-Lopez A, Herreno A, Barbosa H, Herrera J, Ardila A, et al. Systems biology study of mucopolysaccharidosis using a human metabolic reconstruction network. Mol Genet Metab. 2016;117(2):129-39. Epub 2015/08/16.
45. Clark NE, Metcalf MC, Best D, Fleet GW, Garman SC. Pharmacological chaperones for human alpha-N-acetylgalactosaminidase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(43):17400-5. Epub 2012/10/10.
46. Olarte Sergio R-LA, Almeciga-Diaz Carlos A pharmacological chaperone for human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase enzyme: an in-silico analysis. Molecular Genetics and Metabolism. 2014;111(2):S82.
47. Alméciga-Díaz CJ, Pimentel-Vera LN, Caro A, Mosquera A, Castellanos Moreno CA, Manosalva Rojas JP, et al. Virtual Screening of Potential Inhibitors for SARS-CoV-2 Main Protease. Preprints. 2020:2020040146.
48. Lanpher B, Brunetti-Pierri N, Lee B. Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. Nat Rev Genet. 2006;7(6):449-60. Epub 2006/05/19.
49. Scriver CR. Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter 'Inborn Errors of Metabolism': albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. J Inherit Metab Dis. 2008;31(5):580-98. Epub 2008/10/14.
50. Barrera LA. Los Errores Innatos del Metabolismo, fuente inagotable de conocimiento médico por más de un siglo, siguen sin diagnosticarse y tratarse en Colombia. Redalyc. 2005;3(13-17).
51. Barrera LA. Estudios bioquímicos de los errores innatos del metabolismo en Colombia, durante dos décadas. . Rev Acad Colomb Cienc. 2009;33(128):377-94.
52. Barrera LA, Sáenz H, Cuéllar YM, Ospina SY, Garzón K, Cabrera MA, et al. Manual de enfermedades metabolicas2004.

53. Hawkins-Salsbury JA, Reddy AS, Sands MS. Combination therapies for lysosomal storage disease: is the whole greater than the sum of its parts? Hum Mol Genet. 2011;20(R1):R54-60. Epub 2011/03/23.
54. Vitner EB, Platt FM, Futerman AH. Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. J Biol Chem. 2010;285(27):20423-7. Epub 2010/05/01.
55. Leal AF, Espejo-Mojica AJ, Sánchez OF, Ramírez CM, Reyes LH, Cruz JC, et al. Lysosomal storage diseases: current therapies and future alternatives. J Mol Med (Berl). 2020;In press:1-16. Epub 2020/06/11.
56. Esko JD, Kimata K, Lindahl U. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. 2009. Epub 2010/03/20.
57. Linhardt RJ, Toida T. Role of glycosaminoglycans in cellular communication. Accounts of chemical research. 2004;37(7):431-8. Epub 2004/07/21.
58. Jakobkiewicz-Banecka J, Piotrowska E, Gabig-Ciminska M, Borysiewicz E, Slominska-Wojewodzka M, Narajczyk M, et al. Substrate reduction therapies for mucopolysaccharidoses. Curr Pharm Biotechnol. 2011;12(11):1860-5. Epub 2011/09/10.
59. Valayannopoulos V, Wijburg FA. Therapy for the mucopolysaccharidoses. Rheumatology (Oxford). 2011;50 Suppl 5:v49-59. Epub 2012/01/11.
60. Coutinho MF, Lacerda L, Alves S. Glycosaminoglycan storage disorders: a review. Biochem Res Int. 2012;2012:471325. Epub 2011/10/21.
61. Tomatsu S, Fukuda S, Masue M, Sukegawa K, Fukao T, Yamagishi A, et al. Morquio disease: isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. Biochem Biophys Res Commun. 1991;181(2):677-83. Epub 1991/12/16.
62. Masue M, Sukegawa K, Orii T, Hashimoto T. N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in human placenta: purification and characteristics. J Biochem. 1991;110(6):965-70. Epub 1991/12/01.
63. Sardiello M, Annunziata I, Roma G, Ballabio A. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. Hum Mol Genet. 2005;14(21):3203-17. Epub 2005/09/22.
64. Ghosh D. Human sulfatases: a structural perspective to catalysis. Cell Mol Life Sci. 2007;64(15):2013-22. Epub 2007/06/15.
65. Roeser D, Preusser-Kunze A, Schmidt B, Gasow K, Wittmann JG, Dierks T, et al. A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme. PNAS. 2006;103(1):81–6.
66. Sistema de vigilancia en salud pública (Sivigila). Enfermedades huérfanas - raras, Colombia, periodo epidemiológico II. Instituto Nacional de Salud; 2020 [cited 2020 Mayo]; Available from: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ENFERMEDADES%20HUÉRFANAS-RARAS%20PE%20II%202020.pdf
67. Dung VC, Tomatsu S, Montano AM, Gottesman G, Bober MB, Mackenzie W, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: correlation between genotype, phenotype and keratan sulfate levels. Mol Genet Metab. 2013;110(1-2):129-38. Epub 2013/07/24.

68. Peracha H, Sawamoto K, Averill L, Kecskemethy H, Theroux M, Thacker M, et al. Molecular genetics and metabolism, special edition: Diagnosis, diagnosis and prognosis of Mucopolysaccharidosis IVA. Mol Genet Metab. 2018. Epub 2018/05/22.
69. Wood TC, Harvey K, Beck M, Burin MG, Chien YH, Church HJ, et al. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. J Inherit Metab Dis. 2013;36(2):293-307. Epub 2013/02/02.
70. Lavery C, Hendriksz C. Mortality in patients with morquio syndrome a. JIMD reports. 2015;15:59-66. Epub 2014/04/11.
71. Tuysuz B, Alkaya DU, Toksoy G, Gunes N, Yildirim T, Bayhan IA, et al. Mutation spectrum and pivotal features for differential diagnosis of Mucopolysaccharidosis IVA patients with severe and attenuated phenotype. Gene. 2019;704:59-67. Epub 2019/04/14.
72. Montaño AM, Tomatsu S, Brusius A, Smith M, Orii T. Growth charts for patients affected with Morquio A Disease. Am J Med Genet. 2008;15(10):1286-95.
73. Pachajoa H, Ruiz-Botero F, Hernández-Amariz M, Eichler S, AO. C-G. Morquio syndrome: New heterozygous mutation of the GALNS gene in two siblings from south-west Colombia. Clinical, molecular, and bioinformatic analysis. Rev Mex Pediatr. 2016;83(3):85-92.
74. Satizabal J, Moreno L. Evaluation and Impact on the Quality of Life of Patients With Mucopolysaccharidosis IV-A (Morquio A) at the Colombian Southwestern. J Inborn Errors Metab Screen. 2017;5:273.
75. Kubaski F, Brusius-Facchin AC, Palhares HM, Balarin MA, Viapiana-Camelier M, Guidobono R, et al. Identification of a novel missense mutation in Brazilian patient with a severe form of mucopolysaccharidosis type IVA. Gene. 2013;517(1):112-5. Epub 2013/01/15.
76. Zanetti A, D'Avanzo F, AlSayed M, Brusius-Facchin AC, Chien Y-H, Giugliani R, et al. Molecular basis of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A syndrome): A review and classification of GALNS gene variants and reporting of 68 novel variants. Human Mutation. 2021;42:1384–98.
77. Pachajoa H, Acosta MA, Alméciga-Díaz CJ, Ariza Y, Diaz-Ordoñez L, Caicedo-Herrera G, et al. Molecular characterization of mucopolysaccharidosis type IVA patients in the Andean region of Colombia. American Journal of Medical Genetics 2021;187(3):388-95.
78. Sukegawa K, Nakamura H, Kato Z, Tomatsu S, Montano AM, Fukao T, et al. Biochemical and structural analysis of missense mutations in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase causing mucopolysaccharidosis IVA phenotypes. Hum Mol Genet. 2000;9(9):1283-90. Epub 2000/05/18.
79. Sudhakar SC, Mahalingam K. Structural and functional analysis of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase using bioinformatics tools: Insight into Mucopolysaccharidosis IVA. Journal of Pharmacy Research. 2011;4(11):3958-62.
80. Olarte-Avellaneda S, Rodríguez A, Alméciga C, Barrera L. Computational analysis of human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase enzyme. Molecular Genetics and Metabolism. 2013;108(2):70-1.

81. Martell L, Lau K, Mei M, Burnett V, Decker C, Foehr ED. Biomarker analysis of Morquio syndrome: identification of disease state and drug responsive markers. Orphanet J Rare Dis. 2011;6:84. Epub 2011/12/20.
82. Tomatsu S, Mackenzie WG, Theroux MC, Mason RW, Thacker MM, Shaffer TH, et al. Current and emerging treatments and surgical interventions for Morquio A syndrome: a review. Research and Reports in Endocrine Disorders. 2012;2:65-77.
83. Sawamoto K, Alvarez Gonzalez JV, Piechnik M, Otero FJ, Couce ML, Suzuki Y, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: Diagnosis, Treatment, and Management. International journal of molecular sciences. 2020;21(4). Epub 2020/02/28.
84. Clark BM, Sprung J, Weingarten TN, Warner ME. Anesthesia for patients with mucopolysaccharidoses: Comprehensive review of the literature with emphasis on airway management. Bosnian journal of basic medical sciences. 2018;18(1):1-7. Epub 2017/06/08.
85. Sáenz H, Barrera LA. La terapia de remplazo enzimático en el tratamiento de enfermedades genéticas Universitas Scientiarum. 2003;8(2):31-42.
86. Tomatsu S, Sawamoto K, Almeciga-Diaz CJ, Shimada T, Bober MB, Chinen Y, et al. Impact of enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation in patients with Morquio A syndrome. Drug design, development and therapy. 2015;9:1937-53. Epub 2015/04/22.
87. Sanford M, Lo JH. Elosulfase alfa: first global approval. Drugs. 2014;74(6):713-8. Epub 2014/04/05.
88. Hendriksz C, Burton BK, Fleming T, Giugliani R, Harmatz P, Hughes D, et al. A multi-national, randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of BMN 110 treatment for mucopolysaccharidosis IVA (Morquio syndrome type A). Molecular Genetics and Metabolism. 2013;108(2):S48.
89. Hendriksz CJ, Burton B, Fleming TR, Harmatz P, Hughes D, Jones SA, et al. Efficacy and safety of enzyme replacement therapy with BMN 110 (elosulfase alfa) for Morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA): a phase 3 randomised placebo-controlled study. J Inherit Metab Dis. 2014;37(6):979-90.
90. Hendriksz CJ, Giugliani R, Harmatz P, Mengel E, Guffon N, Valayannopoulos V, et al. Multi-domain impact of elosufase alfa in Morquio A syndrome in the pivotal phase III trial. Mol Genet Metab. 2014;114(2):178-85.
91. Cleary M, Davison J, Gould R, Geberhiwot T, Hughes D, Mercer J, et al. Impact of long-term elosulfase alfa treatment on clinical and patient-reported outcomes in patients with mucopolysaccharidosis type IVA: results from a Managed Access Agreement in England. Orphanet Journal Rare Diseases. 2021;16(1).
92. Schweighardt B, Tompkins T, Lau K, Jesaitis L, Qi Y, Musson DG, et al. Immunogenicity of elosulfase alfa, an enzyme replacement therapy in patients with Morquio A syndrome: results from MOR-004, a phase III trial. Clin Ther. 2015;37(5):1012-21. Epub 2014/12/10.
93. Do CJ, Wiedemann A, Quinaux T, Battaglia-Hsu SF, Mainard L, Froissart R, et al. 30 months follow-up of an early enzyme replacement therapy in a severe Morquio A patient: About one case. Mol Genet Metab Rep. 2016;9:42-5. Epub 2016/10/21.

94. Doherty C, Stapleton M, Piechnik M, Mason RW, Mackenzie WG, Yamaguchi S, et al. Effect of enzyme replacement therapy on the growth of patients with Morquio A. J Hum Genet. 2019;64:625–35.
95. Tomatsu S, Alméciga-Díaz CJ, Montaño AM, Yabe H, Tanaka A, Dung VC, et al. Therapies for the bone in mucopolysaccharidoses. Mol Genet Metab. 2015;114(2):94-109.
96. Tomatsu S., Montaño A., Ohashi A., Oikawa. H, Oguma. T, Dung. VC, et al. Enzyme replacement therapy in a murine model of Morquio A syndrome. Hum Mol Genet. 2007;17(6):815-24.
97. Dvorak-Ewell M, Wendt D, Hague C, Christianson T, Koppaka V, Crippen D, et al. Enzyme replacement in a human model of mucopolysaccharidosis IVA in vitro and its biodistribution in the cartilage of wild type mice. PLoS One. 2010;5(8):e12194. Epub 2010/09/03.
98. Akyol MU, Alden TD, Amartino H, Ashworth J, Belani K, Berger KI, et al. Recommendations for the management of MPS IVA: systematic evidence- and consensus-based guidance. Orphanet J Rare Dis. 2019;14(1):137. Epub 2019/06/15.
99. Hendriksz CJ, Berger KI, Giugliani R, Harmatz P, Kampmann C, Mackenzie WG, et al. International guidelines for the management and treatment of Morquio A syndrome. American journal of medical genetics Part A. 2015;167A(1):11-25. Epub 2014/10/28.
100. Puentes-Tellez A, Rojas-Rodríguez F, Suarez D, Hidalgo OA, Almeciga-Diaz CJ. Evaluation of lentiviral vectors in Morquio syndrome type A patients' fibroblasts. Molecular Genetics and Metabolism. 2019;126(2):S120.
101. Almeciga-Diaz CJ, Montano AM, Barrera LA, Tomatsu S. Tailoring the AAV2 capsid vector for bone-targeting. Pediatr Res. 2018;84(4):545-51. Epub 2018/10/17.
102. Alméciga-Díaz CJ, Cuaspa R, Herrera J, Barbosa H, Barrera L. New viral vectors for Morquio syndrome type A gene therapy. Molecular Genetics and Metabolism. 2013;108(2):S19-S.
103. Alméciga-Díaz C, Montaño AM, Tomatsu S, Barrera L. Adeno-associated virus gene transfer on Morquio A: effect of promoters and sulfatase-modifying Factor 1. FEBS Journal. 2010;277(17):3608-19.
104. Alméciga-Díaz C, Rueda-Paramo M, Espejo A, Echeverri O, Montaño A, Tomatsu S, et al. Effect of Elongation Factor 1α promoter and SUMF1 over in-vitro expression of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. Molecular Biology Reports. 2009;36(7):1863-70.
105. Sawamoto K, Karumuthil-Melethil S, Khan S, Stapleton M, Bruder JT, Danos O, et al. Liver-Targeted AAV8 Gene Therapy Ameliorates Skeletal and Cardiovascular Pathology in a Mucopolysaccharidosis IVA Murine Model. Molecular therapy Methods & clinical development. 2020;18:50-61. Epub 2020/06/25.
106. Toietta G, Severini GM, Traversari C, Tomatsu S, Sukegawa K, Fukuda S, et al. Various cells retrovirally transduced with N-acetylgalactosoamine-6-sulfate sulfatase correct Morquio skin fibroblasts in vitro. Hum Gene Ther. 2001;12(16):2007-16.

107. Álvarez JV, Herrero Filgueira C, González AF, Colón Mejeras C, Beiras Iglesias A, Tomatsu S, et al. Enzyme-Loaded Gel Core Nanostructured Lipid Carriers to Improve Treatment of Lysosomal Storage Diseases: Formulation and In Vitro Cellular Studies of Elosulfase Alfa-Loaded Systems. Pharmaceutics. 2019;11(10). Epub 2019/10/11.
108. Rodriguez-Lopez A, Pimentel-Vera LN, Espejo-Mojica AJ, Van HA, Tiels P, Tomatsu S, et al. Characterization of human recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in Pichia pastoris as potential enzyme for mucopolysaccharidosis IVA treatment. J Pharm Sci. 2019;108(8):2534-41. Epub 2019/04/09.
109. Sawamoto K, Tomatsu S. Development of substrate degradation enzyme therapy for Mucopolysaccharidosis IVA murine model. Int J Mol Sci. 2019;20(17). Epub 2019/08/24.
110. Pereira DM, Valentao P, Andrade PB. Tuning protein folding in lysosomal storage diseases: the chemistry behind pharmacological chaperones. Chemical science. 2018;9(7):1740-52. Epub 2018/05/03.
111. Mohamed FE, Al-Gazali L, Al-Jasmi F, Ali BR. Pharmaceutical Chaperones and Proteostasis Regulators in the Therapy of Lysosomal Storage Disorders: Current Perspective and Future Promises. Frontiers in pharmacology. 2017;8:448. Epub 2017/07/25.
112. Fan J-Q, Ishii S. Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease Yin and Yang of enzyme inhibitors. FEBS Journal. 2007;274:4962-71.
113. Valenzano KJ, Khanna R, Powe AC, Boyd R, Lee G, Flanagan JJ, et al. Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. Assay Drug Dev Technol. 2011;9(3):213-35. Epub 2011/05/27.
114. Gamez A, Yuste-Checa P, Brasil S, Briso-Montiano A, Desviat LR, Ugarte M, et al. Protein misfolding diseases: Prospects of pharmacological treatment. Clin Genet. 2018;93(3):450-8. Epub 2017/07/04.
115. McCafferty EH, Scott LJ. Migalastat: A Review in Fabry Disease. Drugs. 2019;79(5):543-54. Epub 2019/03/16.
116. Hughes DA, Nicholls K, Shankar SP, Sunder-Plassmann G, Koeller D, Nedd K, et al. Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. Journal of medical genetics. 2017;54(4):288-96. Epub 2016/11/12.
117. Maegawa GH, Tropak M, Buttner J, Stockley T, Kok F, Clarke JT, et al. Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of GM2 gangliosidosis. J Biol Chem. 2007;282(12):9150-61. Epub 2007/01/24.
118. Ho SL. Structural Bioinformatics Analysis of Acid Alpha-Glucosidase Mutants with Pharmacological Chaperones. Bioinformatics – Trends and Methodologies. 2011:313-24.
119. Parenti G, Andria G, Valenzano KJ. Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of

Lysosomal Storage Disorders. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2015;23(7):1138-48. Epub 2015/04/17.
120. Hoshina H, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T. Chaperone effect of sulfated disaccharide from heparin on mutant iduronate-2-sulfatase in mucopolysaccharidosis type II. Molecular genetics and metabolism. 2017;123(2):118-22. Epub 2018/01/01.
121. Narita A, Shirai K, Itamura S, Matsuda A, Ishihara A, Matsushita K, et al. Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. Annals of clinical and translational neurology. 2016;3(3):200-15. Epub 2016/04/05.
122. Zimran A, Altarescu G, Elstein D. Pilot study using ambroxol as a pharmacological chaperone in type 1 Gaucher disease. Blood cells, molecules & diseases. 2013;50(2):134-7. Epub 2012/10/23.
123. Priya Kishnani BS, Drago Bratkovic, Barry J. Byrn, Paula R. Clemens, Ozlem Goker-Alpan, Xue Ming, Mark Roberts, Peter Schwenkreis, Kumaraswamy Sivakumar, Ans T. van der Ploeg, Vipul Jain, Sheela Sitaraman, Jay A. Barth, Hjalmar Lagast, Tahseen Mozaffar. . First-in-human study of advanced and targeted acid α-glucosidase (AT-GAA) (ATB200/AT2221) in patients with Pompe disease: preliminary functional assessment results from the ATB200-02 trial. Molecular Genetics and Metabolism. 2019;126(2):S86.
124. Clarke JT, Mahuran DJ, Sathe S, Kolodny EH, Rigat BA, Raiman JA, et al. An open-label Phase I/II clinical trial of pyrimethamine for the treatment of patients affected with chronic GM2 gangliosidosis (Tay-Sachs or Sandhoff variants). Mol Genet Metab. 2011;102(1):6-12. Epub 2010/10/12.
125. Osher E, Fattal-Valevski A, Sagie L, Urshanski N, Sagiv N, Peleg L, et al. Effect of cyclic, low dose pyrimethamine treatment in patients with Late Onset Tay Sachs: an open label, extended pilot study. Orphanet J Rare Dis. 2015;10:45. Epub 2015/04/22.
126. Udwadia-Hegde A, Hajirnis O. Temporary Efficacy of Pyrimethamine in Juvenile-Onset Tay-Sachs Disease Caused by 2 Unreported HEXA Mutations in the Indian Population. Child neurology open. 2017;4:2329048X16687887. Epub 2017/05/16.
127. Katsila T, Spyroulias GA, Patrinos GP, Matsoukas MT. Computational approaches in target identification and drug discovery. Computational and structural biotechnology journal. 2016;14:177-84. Epub 2016/06/14.
128. Shoichet BK. Virtual screening of chemical libraries. Nature. 2004;432(7019):862-5. Epub 2004/12/17.
129. Cheng T, Li Q, Zhou Z, Wang Y, Bryant SH. Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review. AAPS J. 2012;14(1):133-41. Epub 2012/01/28.
130. Batool M, Ahmad B, Choi S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. International journal of molecular sciences. 2019;20(11). Epub 2019/06/09.
131. Chen G, Seukep AJ, Guo M. Recent Advances in Molecular Docking for the Research and Discovery of Potential Marine Drugs. Marine drugs. 2020;18(11). Epub 2020/11/05.

132. Olarte-Avellaneda S, Rodríguez A, Sánchez O, Alméciga-Díaz C. Docking Molecular para evaluar la relación estrutura - actividad en fructosiltransferasas producidas por *Aspergillus* sp. Hechos Microbiológicos. 2012;2:53.
133. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. Curr Comput Aided Drug Des. 2011;7(2):146-57. Epub 2011/05/04.
134. de Ruyck J, Brysbaert G, Blossey R, Lensink MF. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. Advances and applications in bioinformatics and chemistry : AABC. 2016;9:1-11. Epub 2016/07/09.
135. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem. 2010;31(2):455-61. Epub 2009/06/06.
136. Osvel CH. Análisis del desempeño de herramientas de acoplamiento molecular para el estudio de interacciones proteína-péptido: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California; 2019.
137. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. International journal of molecular sciences. 2019;20(18). Epub 2019/09/07.
138. Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular Dynamics Simulation for All. Neuron. 2018;99(6):1129-43. Epub 2018/09/22.
139. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. J Comput Chem. 2005;26(16):1701-18. Epub 2005/10/08.
140. Leonardo BC. Simulación por dinámica molecular de membranas de fosfolípidos usando GROMACS: Universidad de Sonora; 2013.
141. Delavan B, Roberts R, Huang R, Bao W, Tong W, Liu Z. Computational drug repositioning for rare diseases in the era of precision medicine. Drug discovery today. 2018;23(2):382-94. Epub 2017/10/22.
142. Rognan D. Development and virtual screening of target libraries. J Physiol Paris. 2006;99(2-3):232-44. Epub 2006/02/07.
143. Breda A, Basso LA, Santos DS, Jr. WFdA. Virtual Screening of Drugs: Score Functions, Docking, and Drug Design. Current Computer-Aided Drug Design. 2008;4:265-72.
144. Hay Mele B, Citro V, Andreotti G, Cubellis MV. Drug repositioning can accelerate discovery of pharmacological chaperones. Orphanet J Rare Dis. 2015;10:55. Epub 2015/05/08.
145. Losada JC, Alméciga CJ, Gonzalez J. In silico identification of pharmacological chaperones for mucopolysaccharidosis type IIIB. Molecular Genetics and Metabolism. 2020;129(2):S101.
146. Olarte-Avellaneda S, Rodríguez-López A, Patiño JD, Alméciga-Díaz CJ, Sánchez OF. In Silico Analysis of the Structure of Fungal Fructooligosaccharides-Synthesizing Enzymes. Interdiscip Sci. 2018;10(1):53-67. Epub 2016/02/15.
147. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem. 2004;25(13):1605-12.

148. Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, Wickstrom L, Hauser KE, Simmerling C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. Journal of chemical theory and computation. 2015;11(8):3696-713. Epub 2015/11/18.
149. Schrödinger. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.3. 2009-2012.
150. Laskowski RA, Chistyakov VV, Thornton JM. PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. Nucleic Acids Res. 2005;33(Database issue):D266-8. Epub 2004/12/21.
151. Tian W, Chen C, Lei X, Zhao J, Liang J. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. Nucleic Acids Res. 2018;46(W1):W363-W7. Epub 2018/06/04.
152. Volkamer A, Kuhn D, Rippmann F, Rarey M. DoGSiteScorer: a web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment. Bioinformatics. 2012;28(15):2074-5. Epub 2012/05/26.
153. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. J Chem Inf Model. 2011;51(10):2778-86.
154. Irwin J, Sterling T, Mysinger M, Bolstad E, Coleman R. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. J Chem Inf Model. 2012;52(7):1757-68. Epub 2012/05/17.
155. Pronk S, Pall S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. Bioinformatics. 2013;29(7):845-54. Epub 2013/02/15.
156. Koziara KB, Stroet M, Malde AK, Mark AE. Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: prediction of hydration free enthalpies. Journal of computer-aided molecular design. 2014;28(3):221-33. Epub 2014/01/31.
157. Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. J Med Chem. 2006;49(11):3315-21. Epub 2006/05/26.
158. Schenk M, Koppisetty CA, Santos DC, Carmona E, Bhatia S, Nyholm PG, et al. Interaction of arylsulfatase-A (ASA) with its natural sulfoglycolipid substrates: a computational and site-directed mutagenesis study. Glycoconj J. 2009;26(8):1029-45. Epub 2009/04/22.
159. Olarte-Avellaneda S, Cepeda Del Castillo J, Rojas-Rodriguez AF, Sanchez O, Rodriguez-Lopez A, Suarez Garcia DA, et al. Bromocriptine as a Novel Pharmacological Chaperone for Mucopolysaccharidosis IV A. ACS medicinal chemistry letters. 2020;11(7):1377-85. Epub 2020/07/18.
160. Tapiero S. Determinación de características clínicas y genotípicas de pacientes colombianos con síndrome de Morquio A: Universidad Ncional de Colombia 2016.
161. Olarte-Avellaneda S, Almeciga-Diaz CJ. In-silico assessment of a potential pharmacological chaperone for human GALNS: evaluation in a mutated protein model. Molecular Genetics and Metabolism. 2018;123(2):S109-S10.
162. Almeciga-Diaz CJ, Hidalgo OA, Olarte-Avellaneda S, Rodriguez-Lopez A. Characterization of two potential pharmacological chaperones for N-

acetylgalactosamine-6-sulfate sulfates (GALNS) enzyme. Molecular Genetics and Metabolism. 2018;123(2):S18.
163. Warriner AH, Saag KG. Prevention and treatment of bone changes associated with exposure to glucocorticoids. Current osteoporosis reports. 2013;11(4):341-7. Epub 2013/10/08.
164. Holt RI, Barnett AH, Bailey CJ. Bromocriptine: old drug, new formulation and new indication. Diabetes, obesity & metabolism. 2010;12(12):1048-57. Epub 2010/10/28.
165. Zabielski R, Lesniewska V, Borlak J, Gregory PC, Kiela P, Pierzynowski SG, et al. Effects of intraduodenal administration of tarazepide on pancreatic secretion and duodenal EMG in neonatal calves. Regulatory peptides. 1998;78(1-3):113-23. Epub 1999/01/08.
166. Herranz R. Cholecystokinin antagonists: pharmacological and therapeutic potential. Medicinal research reviews. 2003;23(5):559-605. Epub 2003/06/06.
167. Walker NM, Simpson JE, Levitt RC, Boyle KT, Clarke LL. Talniflumate increases survival in a cystic fibrosis mouse model of distal intestinal obstructive syndrome. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2006;317(1):275-83. Epub 2005/12/16.
168. Hochhaus G, Barth J, al-Fayoumi S, Suarez S, Derendorf H, Hochhaus R, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexamethasone sodium-m-sulfobenzoate (DS) after intravenous and intramuscular administration: a comparison with dexamethasone phosphate (DP). Journal of clinical pharmacology. 2001;41(4):425-34. Epub 2001/04/18.
169. Miller E, Bates R, Bjorndahl J, Allen D, Burgio D, Bouma C, et al. 16-Epiestriol, a novel anti-inflammatory nonglycogenic steroid, does not inhibit IFN-gamma production by murine splenocytes. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research. 1998;18(11):921-5. Epub 1998/12/19.
170. Scarpignato C, Varga G, Corradi C. Effect of CCK and its antagonists on gastric emptying. J Physiol Paris. 1993;87(5):291-300. Epub 1993/01/01.
171. Wang HH, Portincasa P, Wang DQ. The cholecystokinin-1 receptor antagonist devazepide increases cholesterol cholelithogenesis in mice. European journal of clinical investigation. 2016;46(2):158-69. Epub 2015/12/20.
172. MedicaLook. Dihydroergotoxine review. http://wwwmedicalookcom/reviews/Dihydroergotoxinehtml.
173. Jarquin Gonzalez JD, Elda de Aguirre L, Rodriguez C, Abrego de Aguilar M, Carrillo F, Leon DA, et al. Dihydroxyprogesterone acetophenide 150 mg + estradiol enantate 10 mg as monthly injectable contraceptives. Advances in contraception : the official journal of the Society for the Advancement of Contraception. 1996;12(3):213-25. Epub 1996/09/01.
174. Huang SA, Lie JD. Phosphodiesterase-5 (PDE5) Inhibitors In the Management of Erectile Dysfunction. P & T : a peer-reviewed journal for formulary management. 2013;38(7):407-19. Epub 2013/09/21.

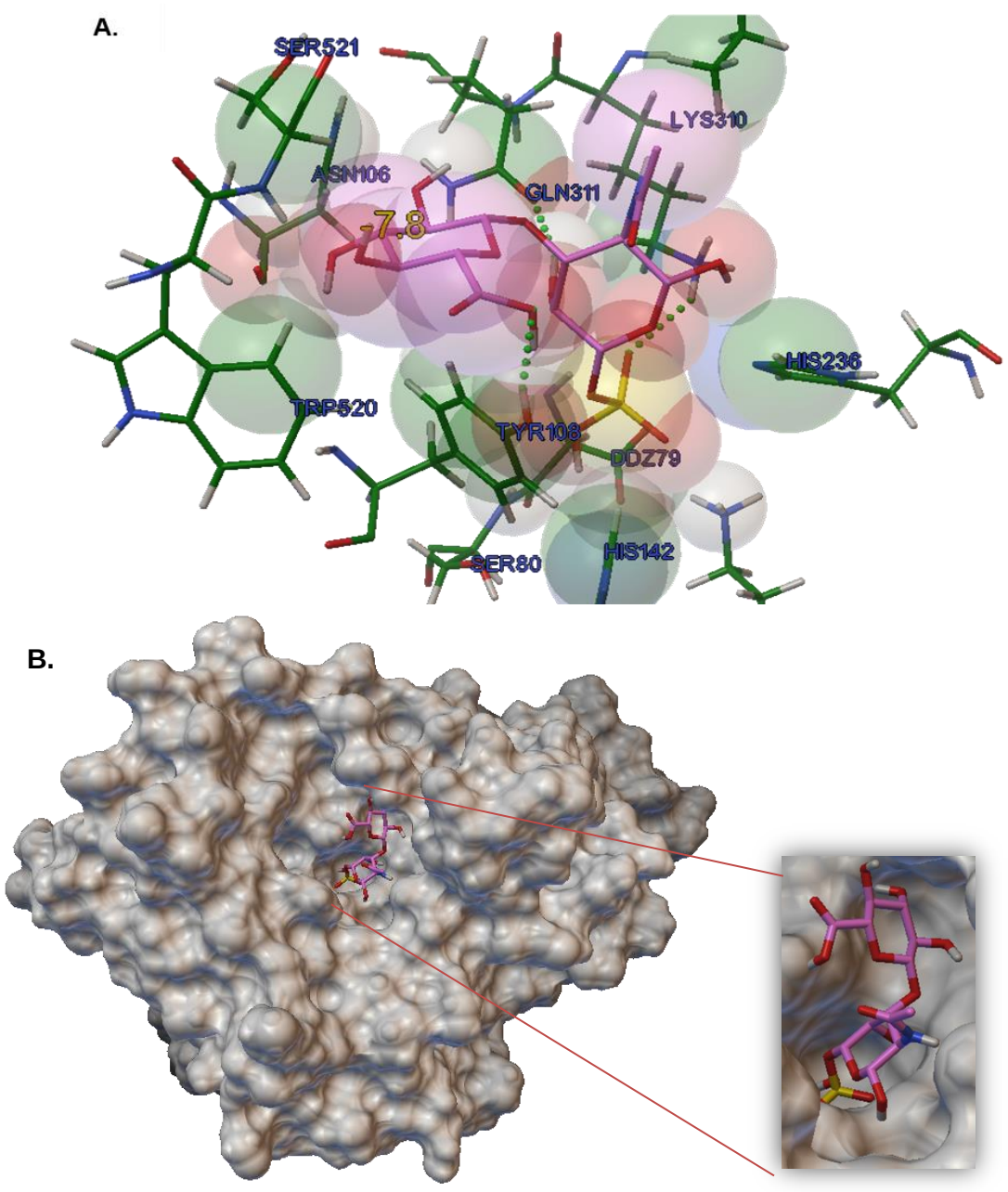
175. Montani D, Chaumais MC, Savale L, Natali D, Price LC, Jais X, et al. Phosphodiesterase type 5 inhibitors in pulmonary arterial hypertension. Advances in therapy. 2009;26(9):813-25. Epub 2009/09/22.
176. Chile PV. Nimorazol. 2015.
177. Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M, Bastholt L, Berthelsen A, Specht L, et al. A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 1998;46(2):135-46. Epub 1998/03/24.
178. Henk JM, Bishop K, Shepherd SF. Treatment of head and neck cancer with CHART and nimorazole: phase II study. Radiother Oncol. 2003;66(1):65-70.
179. Tochowicz A, Dalziel S, Eidam O, O'Connell JD, 3rd, Griner S, Finer-Moore JS, et al. Development and binding mode assessment of N-[4-[2-propyn-1-yl[(6S)-4,6,7,8-tetrahydro-2-(hydroxymethyl)-4-oxo-3H-cyclopenta [g]quinazolin-6-yl]amino]benzoyl]-l-gamma-glutamyl-D-glutamic acid (BGC 945), a novel thymidylate synthase inhibitor that targets tumor cells. J Med Chem. 2013;56(13):5446-55. Epub 2013/05/29.
180. Wang DS, Buckinx R, Lecorronc H, Mangin JM, Rigo JM, Legendre P. Mechanisms for picrotoxinin and picrotin blocks of alpha2 homomeric glycine receptors. J Biol Chem. 2007;282(22):16016-35. Epub 2007/04/05.
181. Wark PAB, Cookson K, Thiruchelvam T, Brannan J, Dorahy DJ. Lumacaftor/Ivacaftor improves exercise tolerance in patients with Cystic Fibrosis and severe airflow obstruction. BMC pulmonary medicine. 2019;19(1):106. Epub 2019/06/19.
182. Pehlivan Y, Dokuyucu R, Demir T, Kaplan DS, Koc I, Orkmez M, et al. Palosuran treatment effective as bosentan in the treatment model of pulmonary arterial hypertension. Inflammation. 2014;37(4):1280-8. Epub 2014/03/08.
183. Nelson GR, Bale JF, Kerr LM. Outcome and Cost of Inpatient Hospitalization for Intravenous Dihydroergotamine Treatment of Refractory Pediatric Headache. Pediatric neurology. 2017;66:76-81. Epub 2016/11/17.
184. Drug Enforcement Administration (DEA) DoJ. Control of Ergocristine, a Chemical Precursor Used in the Illicit Manufacture of Lysergic Acid Diethylamide, as a List I Chemical. https://wwwdeadiversionusdojgov/fed_regs/rules/2011/fr0331htm. 2011.
185. Zur E. Penfluridol, a Unique Psychiatric Medicine for the Treatment of Chronic Schizophrenia. International journal of pharmaceutical compounding. 2019;23(2):113-9. Epub 2019/05/16.
186. Gupta N, Gupta P, Srivastava SK. Penfluridol overcomes paclitaxel resistance in metastatic breast cancer. Scientific reports. 2019;9(1):5066. Epub 2019/03/27.
187. Matsui T, Chiyo T, Kobara H, Fujihara S, Fujita K, Namima D, et al. Telmisartan Inhibits Cell Proliferation and Tumor Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Inducing S-Phase Arrest In Vitro and In Vivo. International journal of molecular sciences. 2019;20(13). Epub 2019/07/03.

188. EMA EMA. Telmisartán. Ficha técnica o resumen de las características del producto. .
189. Kim TO, Despotovic J, Lambert MP. Eltrombopag for use in children with immune thrombocytopenia. Blood advances. 2018;2(4):454-61. Epub 2018/03/01.
190. Michael Besser G, Pfeiffer RF, Thorner MO. ANNIVERSARY REVIEW: 50 years since the discovery of bromocriptine. European journal of endocrinology. 2018;179(2):R69-R75. Epub 2018/05/13.
191. Ozery M, Wadhwa R. Bromocriptine. StatPearls. Treasure Island (FL)2020.
192. Schwartz SS, Zangeneh F. Evidence-based practice use of quick-release bromocriptine across the natural history of type 2 diabetes mellitus. Postgraduate medicine. 2016;128(8):828-38. Epub 2016/07/28.
193. Chan JF, Chik KK, Yuan S, Yip CC, Zhu Z, Tee KM, et al. Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor. Antiviral research. 2017;141:29-37. Epub 2017/02/12.
194. Carrillo J, Agra N, Fernandez N, Pestana A, Alonso J. Devazepide, a nonpeptide antagonist of CCK receptors, induces apoptosis and inhibits Ewing tumor growth. Anti-cancer drugs. 2009;20(7):527-33. Epub 2009/05/02.
195. Springer A. Devazepide. https://adisinsightspringercom/drugs/800000913. 2008.
196. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(46):18843-8. Epub 2011/10/07.
197. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. The New England journal of medicine. 2015;373(3):220-31. Epub 2015/05/20.
198. Ratjen F, Hug C, Marigowda G, Tian S, Huang X, Stanojevic S, et al. Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6-11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. The Lancet Respiratory medicine. 2017;5(7):557-67. Epub 2017/06/14.
199. Lancho IE. Búsqueda de moléculas con potencial terapéutico para la enfermedad de Alzheimer mediante análisis de virtual screening. . Universitat Oberta de Catalunya 2019
200. Liu Q, Sabirzhanova I, Bergbower EAS, Yanda M, Guggino WG, Cebotaru L. The CFTR Corrector, VX-809 (Lumacaftor), Rescues ABCA4 Trafficking Mutants: a Potential Treatment for Stargardt Disease. Cell Physiol Biochem. 2019;53(2):400-12.
201. Vogt L, Chiurchiu C, Chadha-Boreham H, Danaietash P, Dingemanse J, Hadjadj S, et al. Effect of the urotensin receptor antagonist palosuran in hypertensive patients with type 2 diabetic nephropathy. Hypertension. 2010;55(5):1206-9. Epub 2010/03/17.
202. Wang Y, Qiao S, Han DW, Rong XR, Wang YX, Xue JJ, et al. Telmisartan Improves Insulin Resistance: A Meta-Analysis. American journal of therapeutics. 2018;25(6):e642-e51. Epub 2018/03/21.

203. Billecke SS, Marcovitz PA. Long-term safety and efficacy of telmisartan/amlodipine single pill combination in the treatment of hypertension. Vascular health and risk management. 2013;9:95-104. Epub 2013/05/11.
204. Wells TG, Portman R, Norman P, Haertter S, Davidai G, Fei W. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of telmisartan in pediatric patients with hypertension. Clinical pediatrics. 2010;49(10):938-46. Epub 2010/08/21.
205. EMA EMA. Restrictions on use of medicines containing ergot derivatives. http://wwwemaeuropaeu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Ergot_derivatives-containing_products/WC500161278pdf. 2014.
206. Catli G, Abaci A, Altincik A, Demir K, Can S, Buyukgebiz A, et al. Hyperprolactinemia in children: clinical features and long-term results. Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM. 2012;25(11-12):1123-8. Epub 2013/01/19.
207. Jara CFJ. Diseños de análogos de isoxazol-5-ilmetanol como posibles inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE). Tesis de grado Universidad Austral de Chile 2016

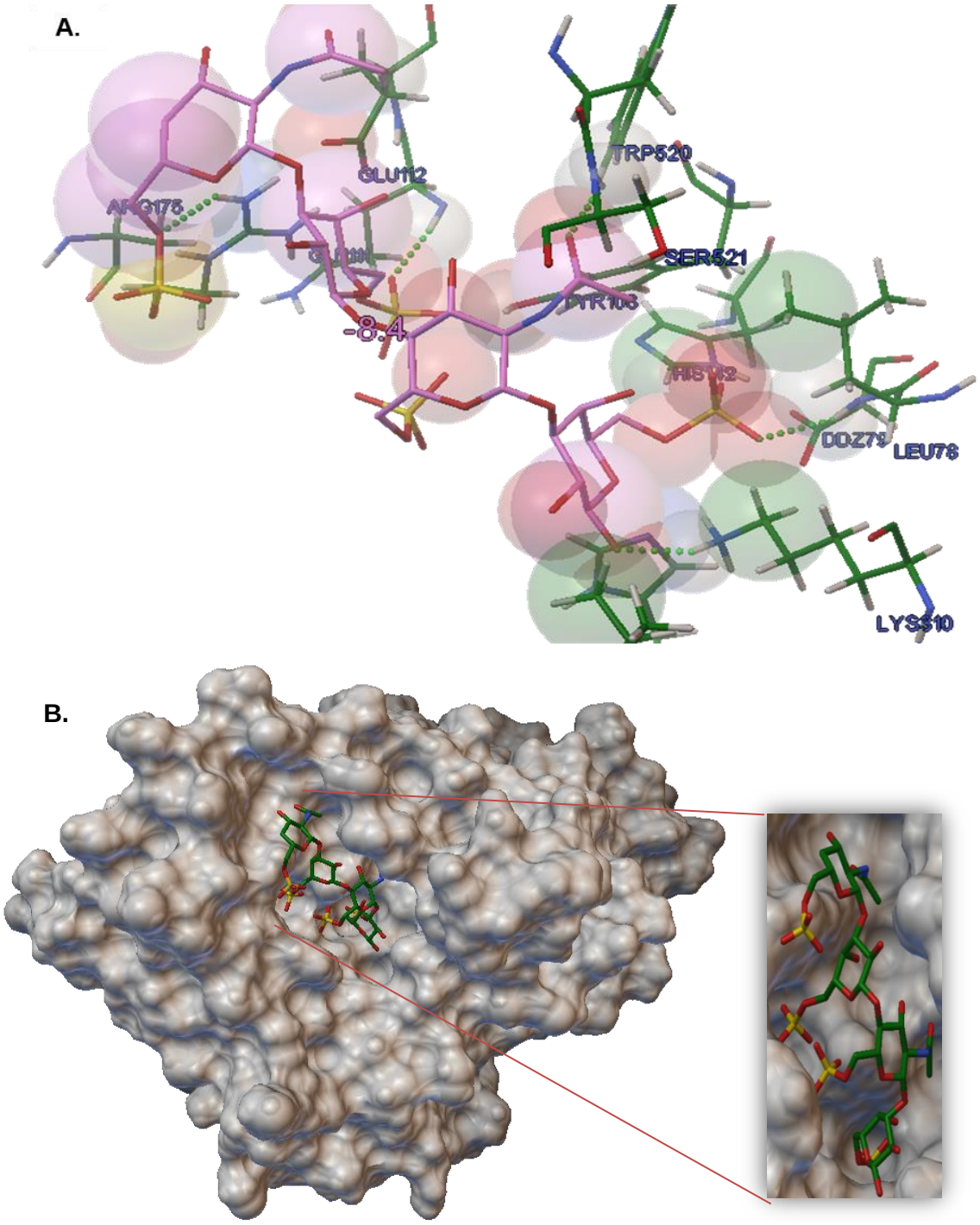
11 Anexos

Anexo 1: Acoplamiento molecular con C6S.



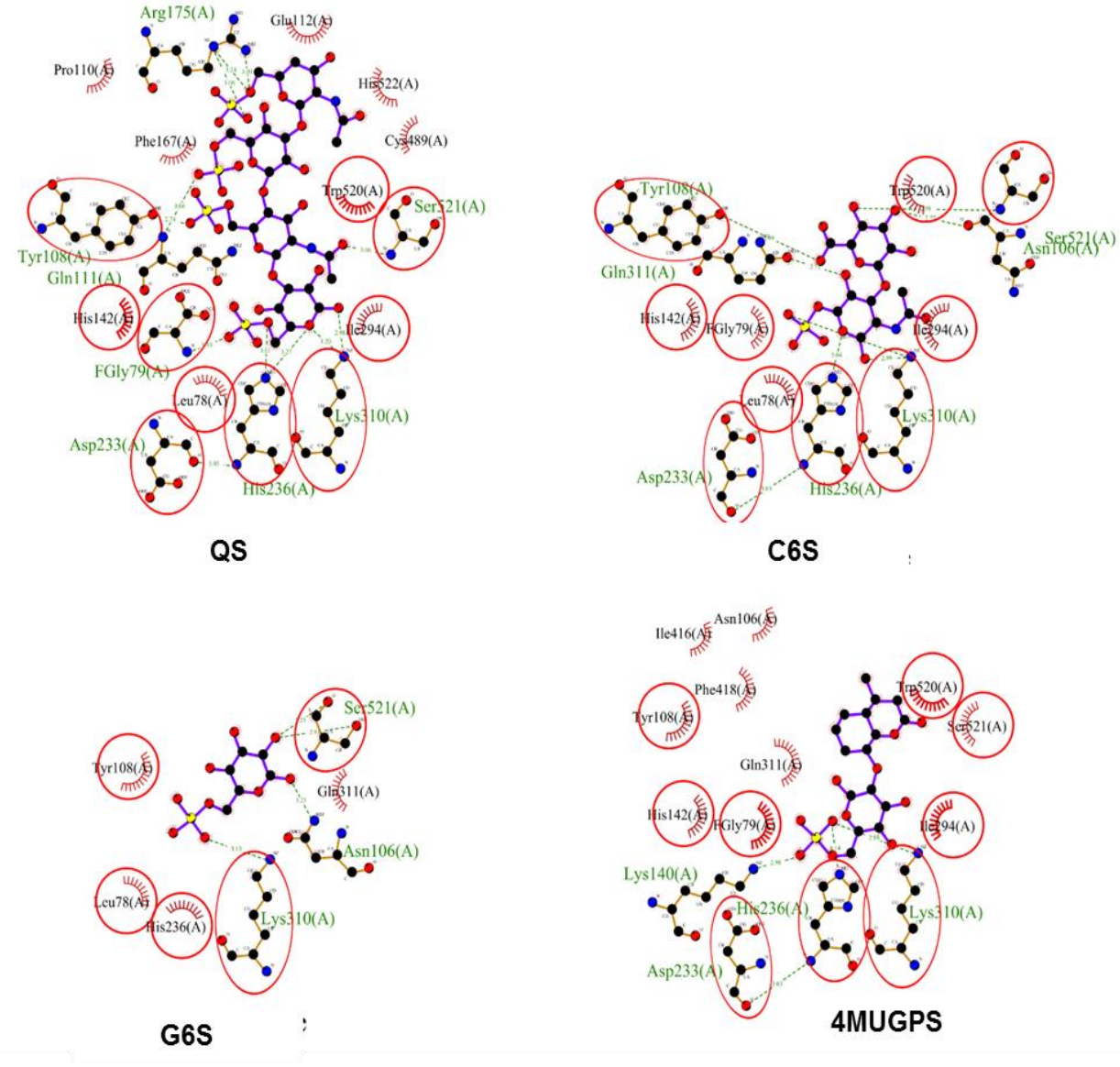
A) Acoplamiento Molecular de GALNS con condroitin-6-sulfato. Interacciones y valor de energía de afinidad son mostrados. Los puentes de hidrógeno son representados como líneas de esferas verdes. B) Superficie molecular de GALNS con el sustrato ubicado en la cavidad catalítica. La ampliación sobre la imagen permite evidenciar como el grupo sulfato (amarillo) queda hacia el fondo de la cavidad.

Anexo 2: Acoplamiento molecular con QS.



A) Acoplamiento Molecular de GALNS con QS. Interacciones y valor de energía de afinidad son mostrados. Puentes de hidrógeno son representados como líneas de esferas verdes. B) Superficie molecular de GALNS donde el grupo sulfato de la galactosa-6-sulfato del ligando natural se ubica hacia el fondo de la cavidad catalítica.

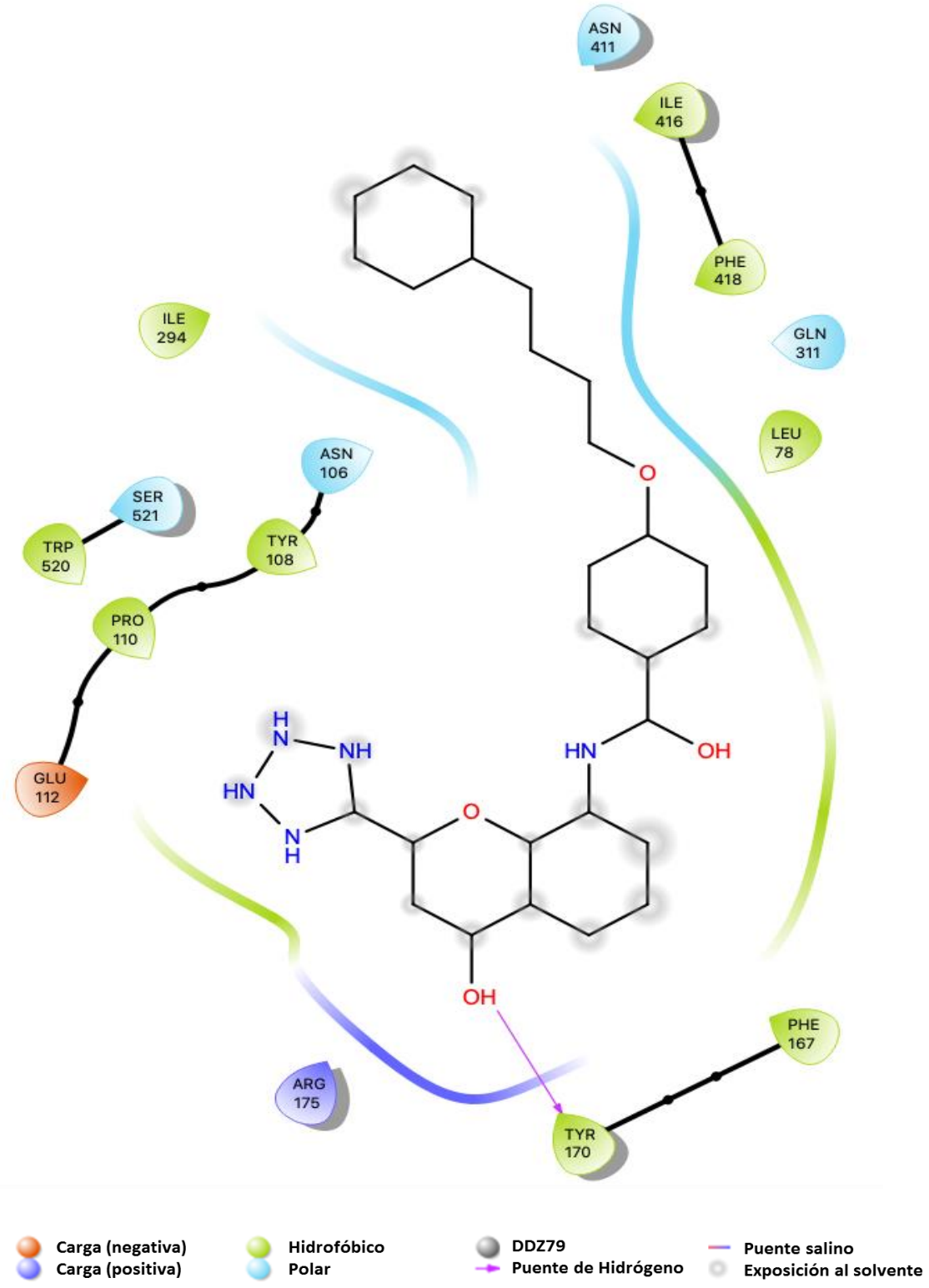
Anexo 3: Interacciones de GALNS con los sustratos naturales y el artificial.



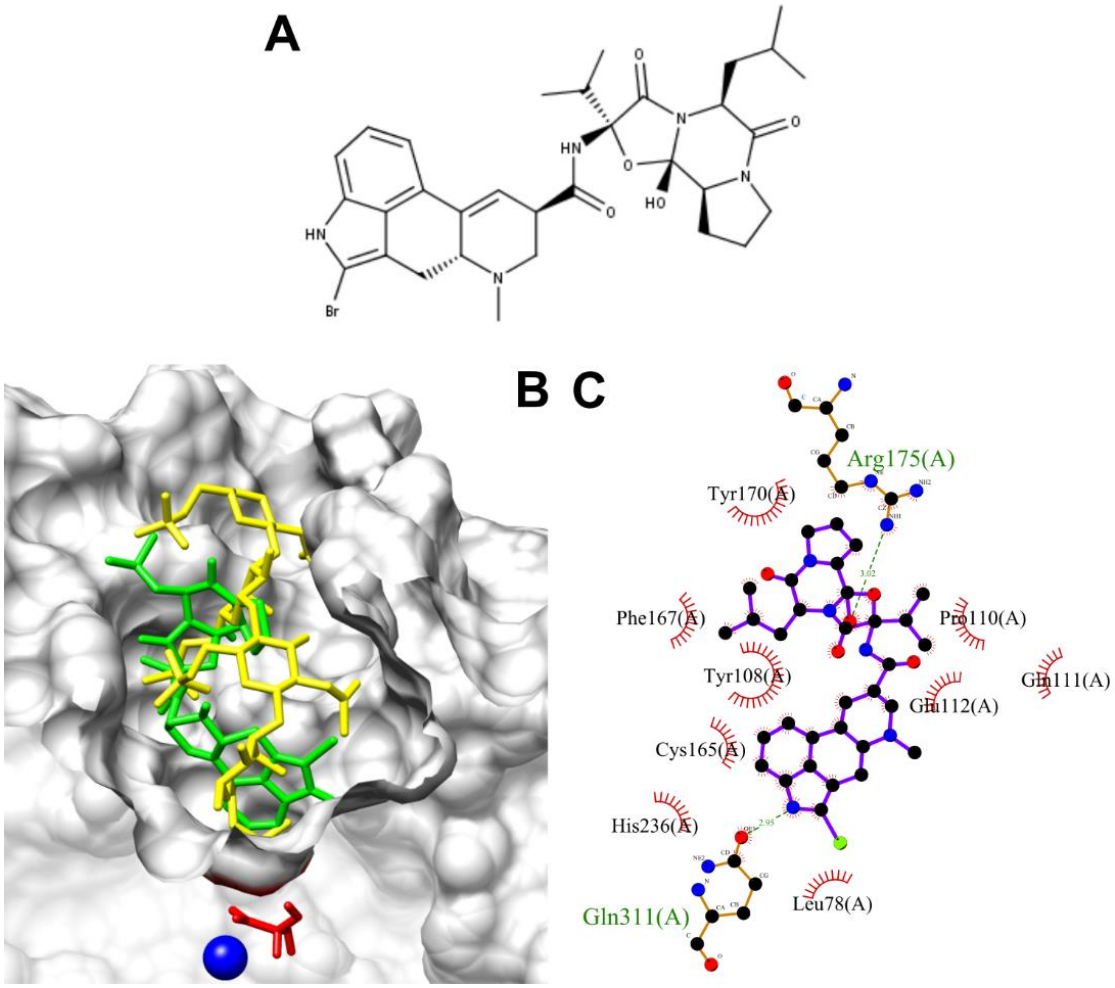
Interacciones proteína – sustrato entre GALNS humana y queratán sulfato (QS), condroitín sulfato (C6S), galactosa-6-sulfato (G6S) y 4MUGPS.

Los círculos rojos corresponden a interacciones conservadas entre todos los sustratos. Residuos en verde y negro interactúan a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, respectivamente.

Anexo 4: Acoplamiento molecular con pranlukast.

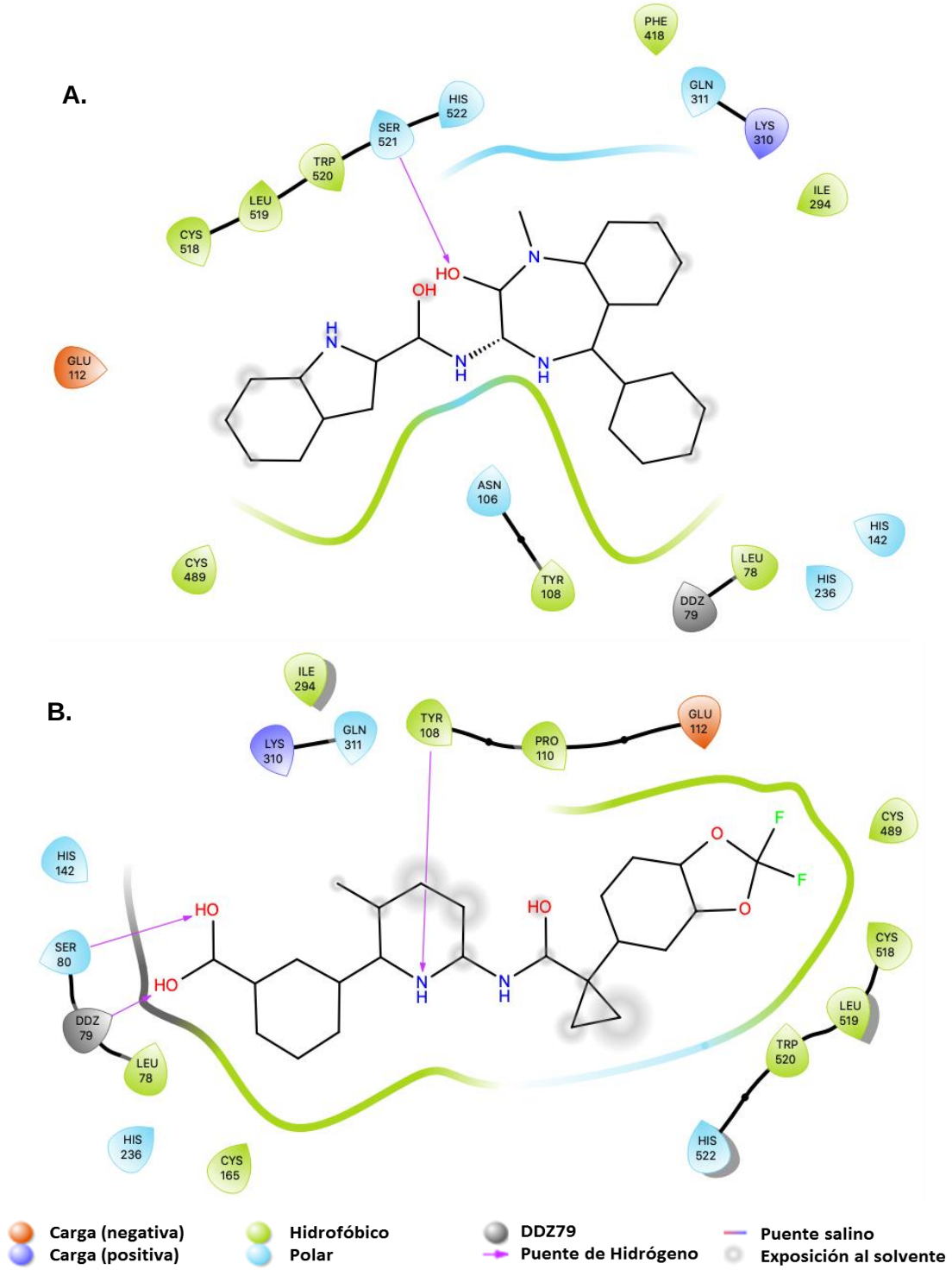


Anexo 5: Acoplamiento molecular con bromocriptina.



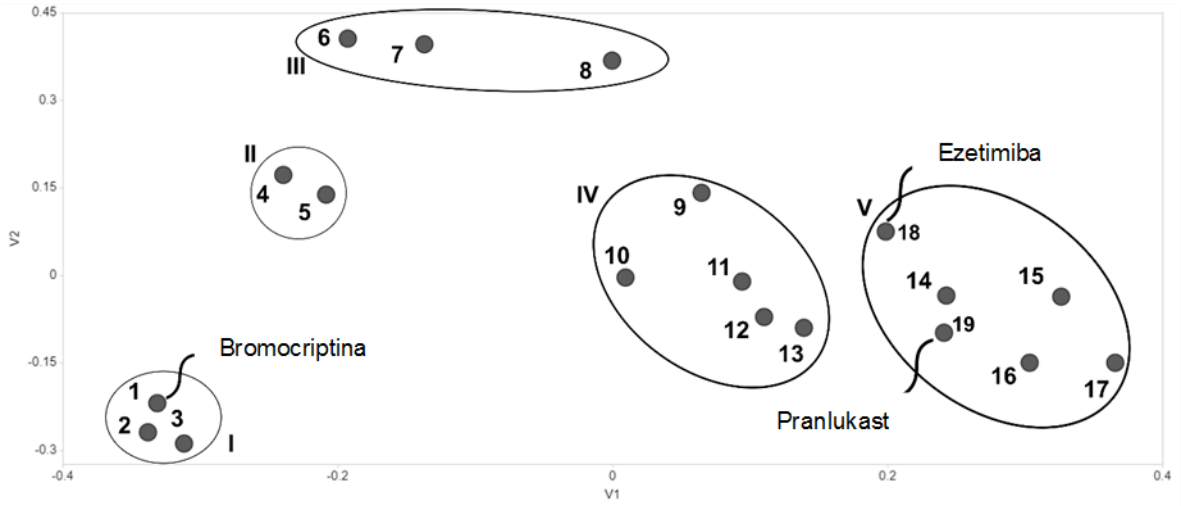
A) Estructura de bromocriptina. B) Acoplamiento de QS (Amarillo) y Bromocriptina (Verde) dentro de la cavidad activa de GALNS, el calcio es mostrado en azul y el aminoácido (FGly79) catalítico en rojo C) Representación en LigPlot+ de las interacciones intermoleculares de GALNS con bromocriptina. Los puentes de hidrógeno son representados por líneas de puntos y los aminoácidos involucrados en las interacciones hidrofóbicas están rodeados por un semicírculo rojo.

Anexo 6: Acoplamiento molecular con Devazepida y Lumacaftor.



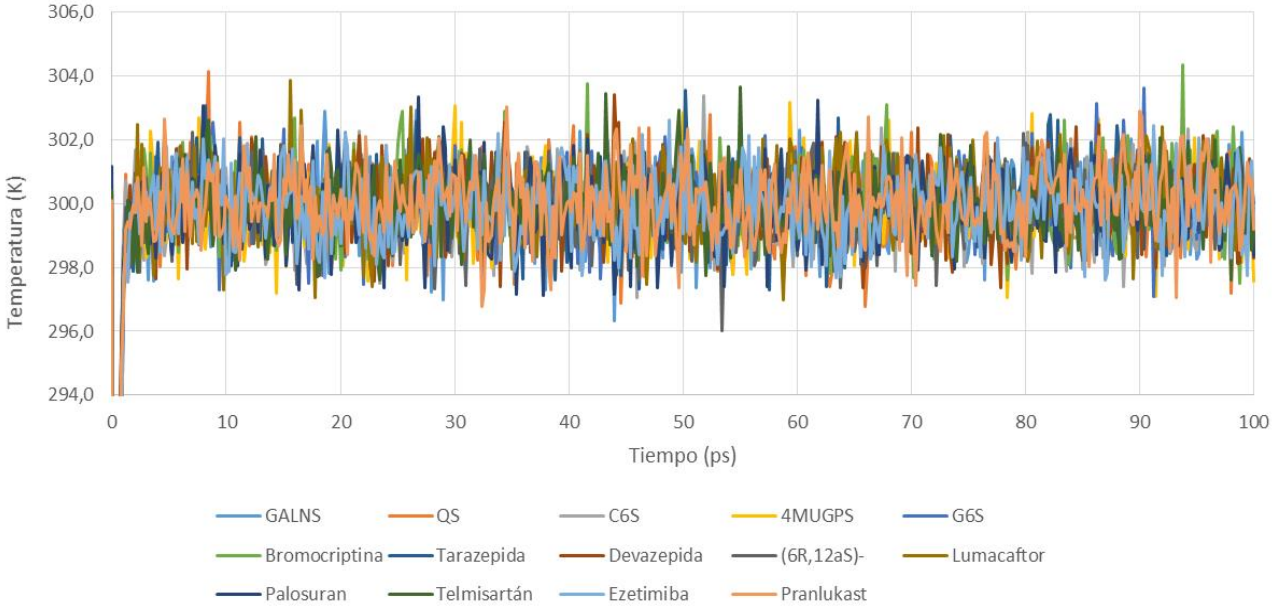
A) Acoplamiento con devazepida. B) Acoplamiento con lumacaftor.

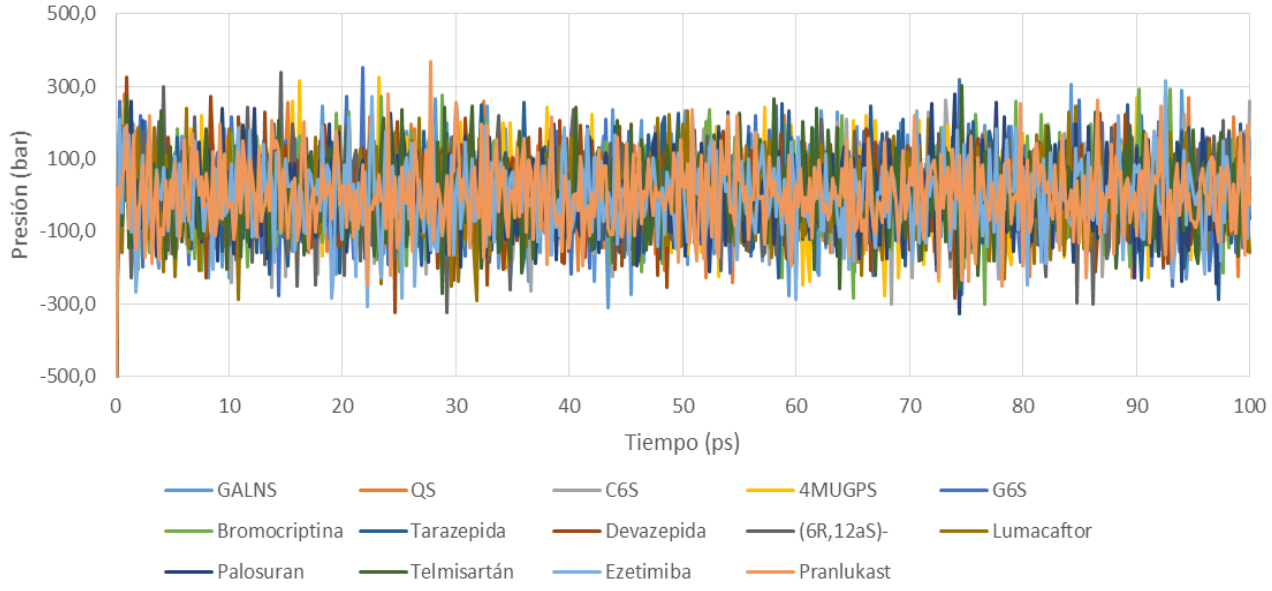
Anexo 7: Clúster del top de moléculas interactuando con GALNS humana.



Clúster del top de moléculas interactuando con GALNS humana. 1. Bromocriptina, 2. Dihidroergotamina, 3. Ergocristina, 4. Acetofenida de algestona, 5. Dexametasona-21-sulfobenzoato, 6. Picrotin, 7. ZINC03872491, 8. Nimorazol, 9. Penfluridol, 10. Palosuran, 11. Bisoctrizole, 12. Plevitrexed, 13. (6S,12ar)-, 14. Lumacaftor, 15. Talniflumato, 16. Tarazepida, 17. Devazepida, 18. Ezetimiba, y 19. Pranlukast.

Anexo 8: Representación gráfica de la variación de temperatura y presión en la etapa de equilibrio.





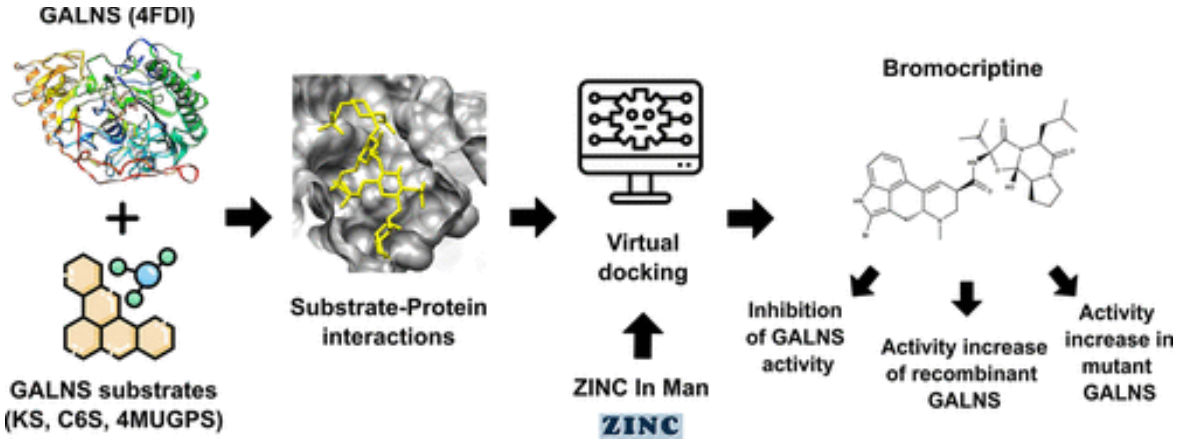
Anexo 9: Datos adicionales de las simulaciones de dinámica molecular.

	Valor final de energía potencial (Minimización)	Promedio Temperatura (Grados Kelvin ± desviación estándar).	Promedio Presión (bar ± desviación estándar).	Valores promedio de energía de unión (kJ/mol-1)
GALNS	-1223963,3	299,83 ± 2,3	-0,92 ± 106,1	NA
QS	-1232004,8	299,77 ± 2,4	-0,34 ± 97,7	-120,9 ± 6,1
C6S	-1226652,5	299,76 ± 2,3	-1,69 ± 100,4	-53,4 ± 2,6
4MUGPS	-1225920,4	299,85 ± 2,3	10,70 ± 100,4	-46,3 ± 2,7
G6S	-1230061,5	299,85 ± 2,4	-1,23 ± 108,3	-33,3 ± 2,0
Bromocriptina	-1238217,7	299,90 ± 2,5	1,88 ± 102,9	-48,2 ± 3,6
Tarazepida	-1259375,6	299,78 ± 2,7	5,70 ± 101,8	-47,3 ± 2,7
Devazepida	-1195577,8	299,93 ± 2,0	4,53 ± 101,7	-89,3 ± 8,7
Tadalafilo	-1261715,4	299,70 ± 2,8	2,34 ± 108,1	-109,6 ± 10,7
Lumacaftor	-1248902,8	299,89 ± 2,7	-0,53 ± 98,4	-44,9 ± 2,9
Palosuran	-1245921,4	299,74 ± 2,6	-1,70 ± 99,1	-47,0 ± 2,3
Telmisartán	-1272507,8	299,75 ± 3,0	0,21 ± 103,1	-111,0 ± 7,7
Ezetimiba	-1269524,9	299,73 ± 2,9	-4,91 ± 100,7	-172,9 ± 19,3
Pranlukast	-1267740,1	299,86 ± 2,9	0,64 ± 102,3	-57,8 ± 3,7

Anexo 10: Productos Académicos.

Artículo de investigación:

Bromocriptine as a Novel Pharmacological Chaperone for Mucopolysaccharidosis IV A: Sergio Olarte-Avellaneda, Jacobo Cepeda Del Castillo, Andrés Felipe Rojas-Rodríguez, Oscar Sánchez, Alexander Rodríguez-López, Diego A. Suárez García, Luz Mary Salazar Pulido, and Carlos J. Alméciga-Díaz. ACS Medicinal Chemistry Letters 2020 11 (7), 1377-1385. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.0c00042



Presentaciones en modalidad de póster:

***In vitro* evaluation of bromocriptine as a potential pharmacological chaperone for morquio a disease:** Cepeda J, Olarte-Avellaneda S, Salazar LM, Alméciga-Díaz CJ. JIEMS Supplement with SLEIMPN 2019 Abstracts.

Evaluation of ezetimibe and pranlukast as pharmacological chaperones for Morquio A: Alméciga-Diaz CJ, Hidalgo OA, Olarte-Avellaneda S, Rodríguez-López A, Pimentel N, Gorshkov K, Li R, Zheng W. JIEMS Supplement with SLEIMPN 2019 Abstracts.

Interaction between the human GALNS crystal structure and different ligands using computational molecular docking: Carlos J Alméciga-Diaz, Sergio Olarte-Avellaneda, Alexander Rodriguez-Lopez. Molecular Genetics and Metabolism. V120 (1–2), January–February 2017, S20-S21. DOI 10.1016/j.ymgme.2016.11.021