

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



Niveles de expresión y actividad catalítica de Gal3-O-sulfotransferasas en glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren

ISABEL CASTRO MASSÓ

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas
Mención Biología Celular

DIRECTORES DE TESIS

Dra. María Julieta González Burgos
Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Dr. Sergio Aguilera Covarrubias
Clínica INDISA

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

ISABEL CASTRO MASSÓ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular** en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 14 de enero de 2011.

Prof. Dra. María Julieta González B.
Directora de Tesis

Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dr. Sergio Aguilera Covarrubias
Director de Tesis
Clínica INDISA

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Lorena Norambuena

Prof. Dra. Marcela Hermoso

Prof. Dr. Patricio Smith

Prof. Dr. Rodrigo Quera

.....Dedicada a los pacientes con síndrome de Sjögren

- Agradezco a los pacientes que voluntariamente y con enorme ilusión aceptaron ser parte de este estudio.
- A la Dra. Julieta González por su dedicación y compromiso en la dirección de esta tesis y por guiarme con sus conocimientos y reflexiones por el camino de la ciencia.
- Al Dr. Sergio Aguilera por su preocupación por el bienestar de sus pacientes y por compartir con nosotros sus conocimientos clínicos acerca del síndrome de Sjögren.
- A la Dra. Inka Brockhausen y a sus estudiantes Yin Gao y Changchang Xu, por la enriquecedora pasantía por su laboratorio en Queen's University, Kingston, Ontario, Canadá.
- A los miembros de la comisión evaluadora de esta tesis, Dra. Marcela Hermoso, Dra. Lorena Norambuena, Dr. Patricio Smith y Dr. Rodrigo Quera por sus sugerencias y comentarios críticos.
- A los profesores y compañeros que forman parte del Laboratorio de Biología Celular, Prof. Cecilia Alliende, Prof. Cecilia Leyton, Dr. Rafael Romo, Prof. Nancy Olea, Claudio Molina, Sergio González, Amelina Alborno, Verónica Bahamondes, María José Barrera, Marianela Sánchez, Hsiao Hsin Sung, Juan Cortés, Hery Urra y Denisse Sepúlveda por las muchas cosas que me han enseñado y los agradables momentos que hemos compartido.
- A la Escuela de Tecnología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile por apoyar mi desarrollo académico.
- Agradezco el apoyo generoso de todos los integrantes de los laboratorios del Dr. Norbel Galanti, Dra. Marcela Hermoso, Dr. Ulises Urzúa, Dr. Remigio López, Dr. Mario Galindo, Dra. Lisette Leyton, Dr. Andrew Quest y Dr. Julio tapia.
- A la Dra. Ulla Mandel, *Copenhagen Center for Glycomics (CCG)*, Dinamarca, por la generosa donación del anticuerpo anti β 3Galactosiltransferasa-5 utilizado en esta tesis.
- A Don Osvaldo Almeyda, Don Javier Esparza, Don Ramón Munizaga y Don Claudio Figueroa por su valiosa colaboración desde sus distintas áreas de desempeño.
- Agradezco profundamente a mi familia y a Ricardo por su cariño y apoyo incondicional.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biología Celular del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los profesores Dra. Julieta González Burgos y Dr. Sergio Aguilera Covarrubias. Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1080006.

Todos los individuos participantes en este estudio fueron diagnosticados y clasificados por el Dr. Sergio Aguilera Covarrubias, Reumatólogo de la Clínica INDISA. Esta institución facilita, sin costo, los pabellones e insumos para realizar las biopsias de glándulas salivales labiales, que se practican gratuitamente a los pacientes con fines diagnósticos.

La estadía en el laboratorio de Glicobiología de Queen's University, Kingston, Ontario, Canadá fue financiada con una Beca de Estadías Cortas de Investigación, otorgada por el Departamento de Postgrado y Postítulo de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile. Además, se contó con todo el apoyo logístico y de instrumentación de la Dra. Inka Brockhausen.

ÍNDICE GENERAL	Página
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades del Síndrome de Sjögren	1
2. Características de las mucinas	2
3. MUC5B en glándulas salivales labiales de pacientes con Síndrome de Sjögren	5
4. Secreción de saliva en respuesta a estímulos	9
5. Sulfatación de mucinas	11
6. Sulfatación y Gal3-O-sulfotransferasas	12
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. Pacientes SS e individuos controles	18
2. Obtención de glándulas salivales labiales	19
3. Determinación de los niveles relativos de mRNA	19
3.1. Extracción de RNA total	19
3.2. Electroforesis de RNA en gel denaturante	20
3.3. Síntesis de cDNA	21
3.4. Diseño de partidores específicos	21
3.5. PCR en tiempo real	22
3.6. Análisis de los datos	23
4. Determinación de los niveles relativos de proteínas	24
4.1. Extracción de proteínas	24
4.2. Cuantificación de proteínas	24
4.3. Preparación de las muestras	24
4.4. Separación electroforética de proteínas	24
4.5. Western blot	25
5. Determinación de los niveles de actividad enzimática de Gal3STs	26
5.1. Obtención de los homogeneizados	26
5.2. Estandarización de las condiciones óptimas del ensayo enzimático	26
5.3. Determinación de los niveles de actividad enzimática de Gal3STs	28
6. Determinación de los niveles de actividad enzimática de sialiltransferasas	28
7. Determinación de la actividad de glicosiltransferasas involucradas en la síntesis y extensión de oligosacáridos complejos	29
7.1. Reacción polipéptido GalNAc transferasa	29
7.2. Reacción Galactosil transferasa (core 1, β 3 y β 4 Gal transferasas)	29
7.3. Reacción GlcNAc transferasa	30
8. Análisis estadístico	30

RESULTADOS	Página
1. Determinación de los niveles de mRNA de Gal3ST 2, 3 ,4 y β 3GalT-5	32
1.1. Determinación de los niveles de mRNA de Gal3ST-2	32
1.2. Determinación de los niveles de mRNA de Gal3ST-3	33
1.3. Determinación de los niveles de mRNA de Gal3ST-4	34
1.4. Determinación de los niveles de mRNA de β 3GalT-5	35
2. Determinación de los niveles relativos de proteínas de Gal3ST-2, 4 y β 3-GalT-5	36
2.1. Determinación de los niveles relativos de proteína Gal3ST-2	36
2.2. Determinación de los niveles relativos de proteína Gal3ST-4	37
2.3. Determinación de los niveles relativos de proteína β 3GalT-5	38
3. Cuantificación de la actividad enzimática de Gal3STs y sialiltransferasas en extractos de GSL de pacientes con SS primario e individuos controles.	38
3.1. Cuantificación de los niveles de actividad enzimática de Gal3STs	38
3.2. Cuantificación de la actividad enzimática de sialiltransferasas	40
4. Cuantificación de la actividad enzimática de glicosiltransferasas involucradas en la síntesis y extensión de oligosacáridos complejos.	40
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE TABLAS	Página
TABLA 1. Características de la saliva dependiente del estímulo	10
TABLA 2. Características de las Gal3-O-sulfotransferasas	12
TABLA 3. Estructura de los cores de oligosacáridos y epítopes antigénicos encontrados en las mucinas	13
TABLA 4. Características demográficas, serológicas e histológicas de los individuos controles y pacientes SS	18
TABLA 5. Características de los partidores	22
TABLA 6. Características de los anticuerpos primarios	25
TABLA 7. Eficiencias, razones de expresión relativa y p obtenido para cada gen	32

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
FIGURA 1. Papel de las mucinas en la superficie de las células epiteliales	4
FIGURA 2. Síntesis y ensamblaje intracelular de mucinas poliméricas	5
FIGURA 3. Localización de MUC5B en GSL de individuos controles y pacientes con SS	6
FIGURA 4. Niveles relativos de sulfo-Lewis ^a presentes en MUC5B en 5 individuos controles y 6 pacientes con SS	7
FIGURA 5. Localización del antígeno sulfo-Lewis ^a en GSL de un individuo control y pacientes con SS	8
FIGURA 6. Relación entre número de acinos mucosos positivos para sulfo-Lewis ^a y el flujo salival.	9
FIGURA 7. Modelo de secreción glandular estimulado por vía colinérgica	11
FIGURA 8. Reacción general de sulfotransferencia usando PAPS como sustrato dador	14
FIGURA 9. Comparación de la eficiencia de retención y elución del producto de la reacción Gal3-O-sulfotransferasa	27
FIGURA 10. Síntesis, extensión y modificación secuencial de oligosacáridos complejos asociados al core proteico de las mucinas	31
FIGURA 11. Niveles relativos de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasa 2	33
FIGURA 12. Niveles relativos de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasa 3	34
FIGURA 13. Niveles relativos de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasa 4	35
FIGURA 14. Niveles relativos de mRNA de β 3Galactosiltransferasa-5	36
FIGURA 15. Niveles relativos de proteína de Gal3ST-2	36
FIGURA 16. Niveles relativos de proteína de Gal3ST-4	37
FIGURA 17. Niveles relativos de proteína de β 3GalT-5	38
FIGURA 18. Comparación de los niveles de actividad Gal3ST en GSLs de individuos controles y de pacientes SS	39
FIGURA 19. Comparación de los niveles de actividad sialiltransferasa entre el grupo de pacientes SS y el grupo control	40
FIGURA 20. Comparación de los niveles de actividad de las glicosiltransferasas evaluadas en GSLs de controles y pacientes SS.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
APS	Adenosín fosfosulfato
AS	Ácido siálico
ATP	Adenosín trifosfato
Bn	Benzol
cDNA	DNA codificante
CMP	Citidina monofosfato
Cpm	Cuentas por minuto
Ct	<i>threshold cycle</i>
DE	Desviación estándar
DEPC	Dietil-pirocarbonato
E	Eficiencia de reacción
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
Gal3ST	Galactosa 3-O- sulfotransferasa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GlcNAc6ST	N-acetilglucosamina-6-sulfotransferasa
GSL(s)	Glándula(s) salival(es) labial(es)
h18S	subunidad 18S ribosomal humana
IgG	Inmunoglobulina G
IP3	Inositol 1, 4, 5 trifosfato
IP3R	Receptor de inositol 1, 4, 5 trifosfato
kDa	Kilo Dalton
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico
MMP(s)	Metaloproteinasa(s)
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
mRNA	RNA mensajero
MUC5B	Mucina 5B
MUC7	Mucina 7
No RT	<i>No Reverse Transcription Control</i>
NOD	Ratones diabéticos no obesos
NTC	<i>Not template control</i>
PAP	3'-fosfoadenosin 5'-fosfato
PAPS	3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPI	Pirofosfato
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i>
RIPA	Tampón de radioinmunoprecipitación
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa asociado a transcripción reversa
Scid	Inmunodeficiencia combinada severa
SDS	Sodio dodecil sulfato
sigA	Inmunoglobulina A soluble
SS	Síndrome de Sjögren
SSp	Síndrome de Sjögren primario

TGN	Trans Golgi network
<i>T_m</i>	Temperatura de <i>melting</i>
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
UDP	Uridina difosfato
USF	Flujo salival no estimulado
VNTR	número variable de repeticiones
β3GalT-5	β3-Galactosiltransferasa 5

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune, sistémica y crónica que se caracteriza por la alteración funcional de las glándulas salivales (GS) y lacrimales, que conduce a signos y síntomas de sequedad bucal y ocular.

Los acinos de las GS sintetizan y secretan los productos de la saliva. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular que mantienen la humectación de las mucosas por su capacidad de retener agua. Esta propiedad está dada por los grupos sulfatos y ácido siálico unidos covalentemente a los oligosacáridos asociados al núcleo proteico de las mucinas.

En nuestro laboratorio se demostró recientemente que en las GS de pacientes SS, MUC5B, la mucina oligomérica más abundante de la saliva, se encuentra hiposulfatada, lo que provocaría una pérdida de avidez por el agua, contribuyendo a la sensación de boca seca que experimentan los pacientes. Un hecho relevante es que la reducción de sulfatación es equivalente, tanto en pacientes que tienen un flujo salival no estimulado normal, como en aquellos en que está disminuido. Así, el volumen de agua en la saliva no sería el único factor responsable de la sensación de boca seca, rompiendo un paradigma clásico en esta patología para explicar la sequedad oral en los pacientes con SS.

Los factores involucrados en la sulfatación de las mucinas salivales son diversos. En esta tesis estudiamos los niveles de expresión y actividad de algunas glicosiltransferasas, con énfasis en las sulfotransferasas del complejo de Golgi. Estas enzimas transfieren grupos sulfatos desde un residuo sulfatado activo 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato (PAPS), que actúa como dador, a una posición definida de un oligosacárido aceptor. Postulamos que una disminución en los niveles de expresión y/o actividad de sulfotransferasas explicaría la hiposulfatación de MUC5B en las GS de pacientes SS.

Para abordar ésta hipótesis se desarrollaron los siguientes objetivos específicos: 1) Determinar los niveles de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasas (Gal3STs) 2, 3, 4 y de β 3-Galactosiltransferasa 5 (β 3GalT-5); 2) Determinar los niveles de proteínas de Gal3STs 2, 4 y de β 3GalT-5; 3) Cuantificar la actividad enzimática de Gal3STs y sialiltransferasas y 4) Cuantificar la actividad enzimática de glicosiltransferasas involucradas en la síntesis y extensión de oligosacáridos asociados al núcleo proteico de las mucinas.

Se estudiaron GS labiales de 31 pacientes con SS primario y 31 individuos controles. Los niveles relativos de mRNA se determinaron mediante RT-PCR en tiempo real, mientras que los niveles relativos de proteínas se determinaron mediante western blot. Los niveles de actividad enzimática se determinaron mediante reacciones radiactivas *in vitro*, la cuantificación de la radiactividad se realizó luego de purificar los productos obtenidos mediante una doble separación cromatográfica.

Nuestros resultados demuestran que en GS de pacientes SS, las glicosiltransferasas que sintetizan los oligosacáridos, sustratos de sulfotransferasas, presentan una actividad enzimática similar a los individuos controles. Al evaluar la actividad de sialiltransferasas tampoco encontramos cambios en GS de pacientes SS respecto a los controles. Sin embargo, la actividad enzimática de sulfotransferasas mostró una disminución significativa en GS de pacientes SS ($p = 0,0004$). Este cambio no presenta correlación con los niveles de expresión relativa de mRNA y proteínas de estas enzimas. Concluimos que la disminución de la actividad sulfotransferasa explicaría la hiposulfatación de mucinas observada en GS de pacientes SS.

La implementación de futuras terapias que consideren la calidad de las mucinas salivales permitirá reducir la sensación de sequedad bucal y mejorar la calidad de vida de los pacientes con síndrome de Sjögren.

Sjögren syndrome (SS) is a systemic, chronic autoimmune disease characterized by functional alterations of lachrymal and salivary glands (SG) leading to eye and mouth dryness. GS acini synthesize saliva components including mucins. Mucins are high molecular weight glycoproteins essential to keep hydrated mucosa because of their ability to retain water. This property is due to sulfate and sialic acid groups covalently bonded to the protein backbone of mucins.

Our group has recently demonstrated that MUC5B, the most abundant oligomeric mucin in saliva, is found hyposulfated in SG of SS-patients. Thus, dry mouth sensation in these patients could be partly due to a loss of water binding ability. Importantly, decreased sulfation is observed in patients showing either a normal or a decreased unstimulated salivary flow. Therefore, water content of saliva would not be the only factor responsible of dry mouth sensation, breaking a classical paradigm to explain this symptom in patients affected by SS.

Diverse factors are involved in salivary mucins sulfation. In this thesis, the expression levels and activities of selected glycosyltransferases, particularly sulfotransferases associated to Golgi complex, were studied. These enzymes transfer sulfate groups from an active sulfated 3'-phosphoadenosin-5'-phosphosulphate (PAPS) donor to an acceptor oligosaccharide. We postulate that a decreased sulfotransferase expression and/or activity may account for MUC5B hyposulfation in GS from SS patients.

To approach this hypothesis, the following specific aims were addressed: 1) To determine Gal3-O-sulfotransferases (Gal3STs) 2, 3, 4 and β 3-galactosyltransferase 5 (β 3GalT-5) mRNA levels; 2) To determine Gal3STs 2, 4 and β 3GalT-5 protein levels; 3) To measure Gal3STs and sialyltransferase enzymatic activities and 4) To measure enzymatic activities of glycosyltransferases involved in synthesis and extension of oligosaccharides bonded to mucin proteins.

SG from 31 SS-patients and 31 control subjects were studied. Relative mRNA levels were determined by real-time RT-PCR, while relative protein levels were measured by Western blot. Enzymatic activity was addressed by *in vitro* [35 S]-based assays. Prior to radioactive counting, labeled products were purified by a two-step chromatographic procedure.

Our results show that the activity of glycosyltransferases, enzymes that synthesize oligosaccharides which are sulfotransferase substrates, show similar levels in SG of controls and SS patients. The same trend was observed in sialyltransferase activity in both groups. However, enzymatic activity of sulfotransferases was significantly decreased in SS-patients ($p = 0.0004$). These findings are not correlated with relative mRNA and protein levels for these enzymes.

We conclude that the decrease of sulfotransferase activity may explain the mucin hyposulfation observed in the SG of SS-patients. Future therapies aimed to address salivary mucin quality will potentially reduce oral dryness improving the life quality of SS patients.

1. Generalidades del Síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune sistémica y crónica que se caracteriza por la alteración funcional de las glándulas salivales y lacrimales. La disminución de la función secretora conduce a signos y síntomas de sequedad bucal y ocular [1]. El carácter autoinmune de la enfermedad está dado principalmente por la presencia de autoanticuerpos anti ribonucleoproteínas Ro/SSA y La/SSB [2]. El SS primario (SSp) se presenta como entidad única y puede comprometer órganos extraglandulares como pulmón, riñón, sistema nervioso central y periférico, piel y órganos linfoides con aumento de la frecuencia de linfomas [3]. Esta patología puede también presentarse asociada a otros desórdenes autoinmunes bien definidos, tales como artritis reumatoídea, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, esclerosis sistémica y tiroiditis, en esas condiciones se denomina SS secundario. El SSp tiene una prevalencia de un 0,5-2,0% en la población adulta a nivel mundial, con un predominio en la población femenina en una razón de 9:1 con respecto a los hombres y se presenta principalmente en la quinta década de la vida [4]. Sin embargo, no hay estudios de la prevalencia de esta enfermedad en nuestro país.

La patogénesis del SS es multifactorial e involucra factores ambientales que desencadenarían la inflamación en individuos con predisposición genética. Entre estos se pueden incluir infecciones virales de la glándula o infecciones recurrentes de cualquier tipo. Por mucho tiempo se ha asignado un rol protagónico a las células mononucleares que infiltran las glándulas en el daño que sufren las células acinares y ductales. Las células mononucleares serían, de acuerdo al modelo clásico de daño glandular, responsables de la atrofia glandular provocada por la apoptosis de células acinares y ductales (citotoxicidad), concomitante a una pérdida de función por una disminución de las unidades secretoras. Además, la pérdida progresiva de la función salival sería producida por la acción de autoanticuerpos, de mediadores inflamatorios solubles y otros [3]. Evidencias relevantes incluyen el aumento en la expresión de proteínas de adhesión que promueven la migración y la producción de quimioquinas que perpetúan el “*homing*” de linfocitos y células dendríticas en la glándula. La destrucción glandular ocurriría por acción de perforinas y granzimas y/o por el mecanismo de Fas/Fas ligando [4].

Otras evidencias muestran que en glándulas salivales de ratones diabéticos no obesos con inmunodeficiencia combinada severa, NOD/scid, uno de los modelos murinos de síndrome de Sjögren, aparecen alteraciones morfológicas y bioquímicas en las células epiteliales en ausencia de linfocitos funcionales [5]. Entre los cambios observados está la presencia temprana de actividad de metaloproteinasas (MMPs), enzimas que degradan proteínas de matriz extracelular y además actividad de caspasas, enzimas que participan en la apoptosis [6].

En nuestro laboratorio se han acumulado evidencias que permiten proponer un mecanismo de daño con participación activa de células acinares y ductales. En este contexto, los resultados muestran que las glándulas salivales labiales (GSL) de los pacientes con SS presentan alteraciones en la estructura, organización y función del parénquima glandular y de la matriz extracelular que ocurren independientemente de la cantidad y cercanía a los focos de células inflamatorias. Además, las células acinares de GSL de pacientes con SS presentan cambios morfológicos que sugieren una alteración en la secreción, como la pérdida de las microvellosidades de la superficie apical, acumulación y coalescencia de gránulos de secreción en el citoplasma. La fusión de los gránulos de secreción con la membrana plasmática y el tráfico de moléculas desde el compartimiento trans-Golgi hacia la superficie apical es un proceso altamente dependiente de la integridad del citoesqueleto y de proteínas específicas que participan en la destinación del gránulo de secreción y que forman parte de la maquinaria molecular exocítica. Las alteraciones en la maquinaria exocítica, probablemente causadas por los cambios estructurales antes mencionados y por la desorganización del citoesqueleto en GSL de pacientes con SS, pueden contribuir a la reducción del flujo salival y a modificaciones en la calidad y cantidad de los productos de secreción en la saliva [7-11]. Una forma de evaluar la funcionalidad del parénquima glandular es determinando la calidad y cantidad de sus productos de secreción característicos, tales como las mucinas.

2. Características de las Mucinas

La saliva es producida por las glándulas salivales mayores (parótida, submandibular y sublingual) y por las glándulas salivales menores (labiales y palatinas) [12]. Las unidades secretoras de las glándulas salivales son los acinos, que sintetizan y secretan los constituyentes de la saliva y los conductos que modifican su osmolaridad y contenido de electrolitos [12]. La

matriz polimérica del mucus de saliva está formada, principalmente, por grandes cadenas de glicoproteínas conocidas como mucinas. Al menos dos tipos de mucinas funcional y estructuralmente distintas están presentes en la saliva humana: las mucinas monoméricas de bajo peso molecular ($1,2-1,5 \times 10^5$ Da), codificada por el gen *MUC7* y las mucinas poliméricas, formadoras de geles, de alto peso molecular ($>10^6$ Da), codificada por el gen *MUC5B* [13]. *MUC7* es sintetizada y secretada por células acinares serosas, mientras que *MUC5B* por células acinares mucosas. Los productos de secreción son almacenados en gránulos y exocitados, principalmente, por la vía de secreción regulada en respuesta a estímulos externos [14]. Las mucinas forman complejos heterotípicos no covalentes con distintos componentes proteicos (lisozima, lactoferrina, transferrina, proteinasas, inhibidores de proteinasas y sIgA), así mantienen el equilibrio de la microbiota de la vía aérea, ya que se combinan para impedir la colonización de la superficie de la mucosa con microorganismos patógenos [14].

El núcleo proteico de las mucinas contiene un dominio compuesto por secuencias aminoacídicas repetidas que en algunos casos incluyen polimorfismos tipo VNTR (número variable de repeticiones). Estas secuencias son ricas en serina, treonina y prolina, los grupos hidroxilos de estos aminoácidos son sitios de unión covalente para una amplia variedad de O-glicanos [15]. Las cadenas de oligosacáridos le confieren importantes propiedades biológicas y estructurales a las mucinas, que incluye la resistencia a proteasas, secuestro de patógenos y retención de iones y agua [15] (Figura 1). Los oligosacáridos de las mucinas presentan ésteres sulfatos y derivados sialilados que las convierten en polímeros polianiónicos hidrofílicos capaces de atrapar grandes cantidades de agua en la superficie epitelial, manteniendo la humectación de las mucosas [16].

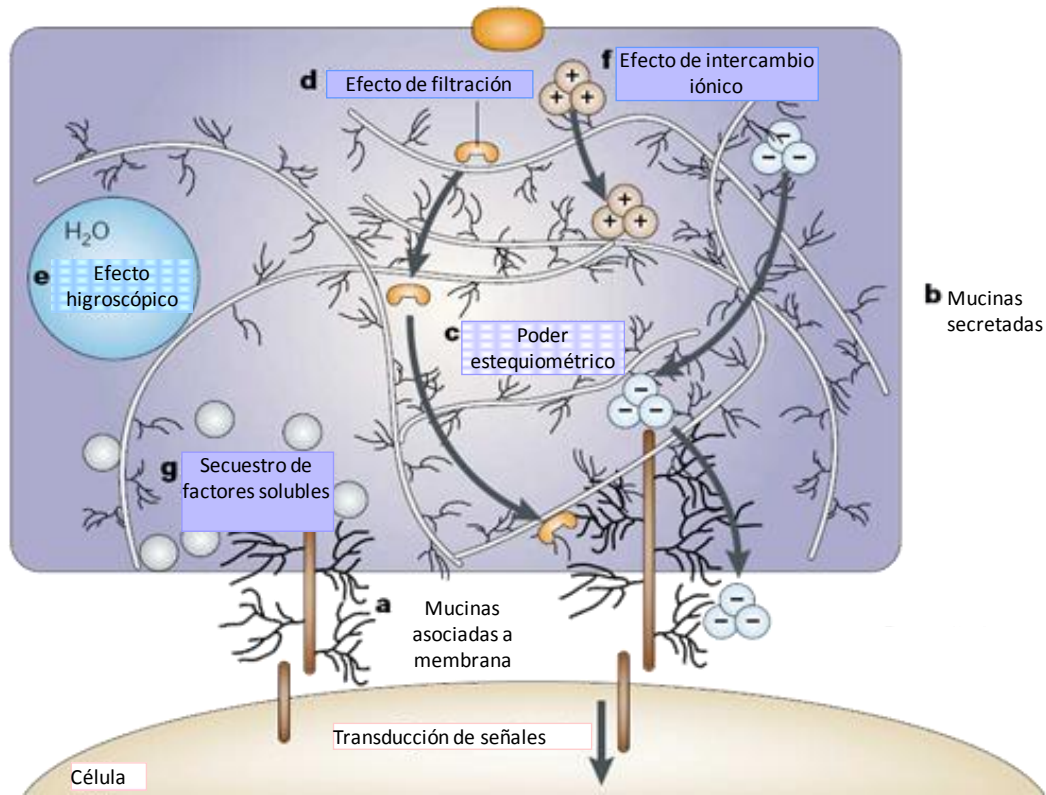


Figura 1. Papel de las mucinas en la superficie de las células epiteliales. a. Las mucinas de transmembrana sirven como sensores moleculares y transducen señales. b. las mucinas secretadas forman una capa viscosa que cubre la superficie epitelial. c. Oligosacáridos neutros y cargados sirven de ligandos para lectinas, selectinas, moléculas de adhesión, bacterias, etc. d. Los microorganismos y moléculas de gran tamaño no pueden tomar contacto con la superficie epitelial por impedimento estérico. e y f. Las mucinas, gracias a sus cargas negativas son higroscópicas y, por lo tanto, relevantes en el grado de hidratación de la superficie celular. g. Las mucinas pueden unir y mantener secuestrados factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, etc. (Modificada de Hollingsworth y Swanson 2004)

Las mucinas formadoras de geles poseen, además de los dominios glicosilados, dominios ricos en cisteína en sus extremos aminos (N) y carboxilos (C) terminales, que son responsables de la formación de polímeros mediante puentes disulfuros [15](Figura 2).

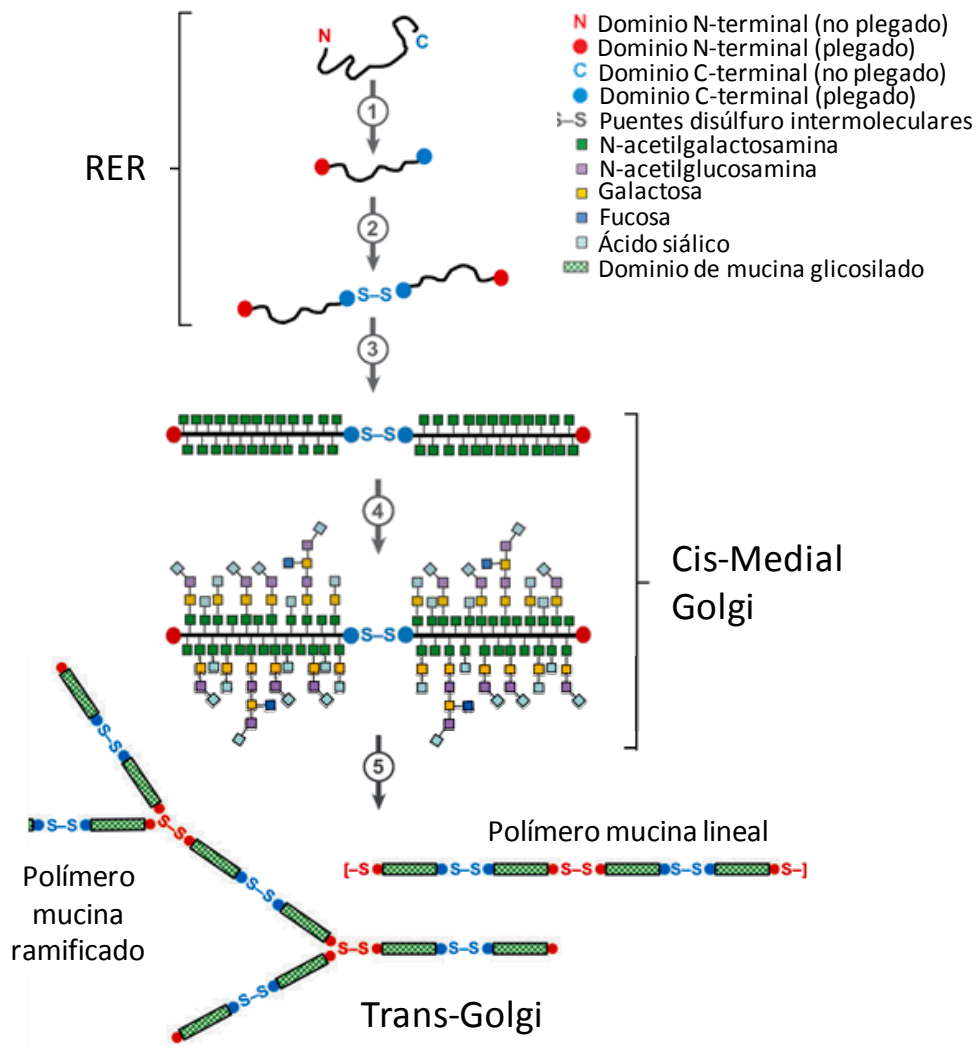


Figura 2. Síntesis y ensamblaje intracelular de mucinas poliméricas. Se muestran los principales pasos de su síntesis y la localización de estos procesos. **1.** En el retículo endoplasmático se sintetizan los núcleos proteicos y se generan puentes disulfuro intramoleculares en los extremos N y C terminales ricos en cisteína. **2.** La dimerización ocurre por formación de puentes disulfuros intermoleculares entre los extremos C-terminales. **3.** En cis-Golgi se adicionan monosacáridos de N- acetil-galactosamina (GalNAc) en los residuos de serina y treonina del dominio repetitivo de la mucina. **4.** A medida que la mucina transita por Golgi se va extendiendo el oligosacárido asociado a la mucina. **5.** En el retículo *trans*-Golgi, o en el gránulo de secreción, las mucinas polimerizan mediante puentes disulfuros entre los extremos N-terminales. La polimerización puede ser lineal o ramificada. (Modificada de Thornton y cols., 2008)

3. MUC5B en glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren

MUC5B es una mucina polimérica secretada y soluble, principal glicoproteína constituyente de la saliva humana. Es producida por todas las glándulas salivales, con excepción de las parótidas. Existen diferentes glicofomas de MUC5B. La caracterización de los carbohidratos asociados a su núcleo proteico revela un conjunto heterogéneo de oligosacáridos que varían en extensión desde 2 hasta más de 40 monosacáridos. Presenta ácido siálico (AS),

fucosa (Fuc), galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilgalactosamina (GalNAc) en razón molar de 1:5:4:3:1, respectivamente [17]. Además, se ha descrito que aproximadamente el 20% de los oligosacáridos asociados a MUC5B son altamente cargados y corresponden a especies sulfatadas [18].

La detección inmunohistoquímica de MUC5B en cortes de GSL de individuos controles y de pacientes con SS, utilizando el anticuerpo PANH2, que reconoce epítopes parcialmente deglicosilados de esta mucina, muestra una distribución de la señal en la región basal de acinos mucosos de individuos controles (Figuras 3A y 3B). La doble tinción con PANH2/Alcian blue pH 1,0 muestra la detección de productos de secreción sulfatados localizados en la región apical de las células acinares mucosas en controles (Figura 3C), este resultado sugiere que el anticuerpo PANH2 no tiene acceso a la mucina a nivel apical por encontrarse glicosilada. En cortes de GSL de pacientes con SS, MUC5B se detecta en las regiones basales y apicales de las células acinares mucosas (Figuras 3D y 3E), contrariamente a lo observado en controles, la distribución apical de la señal sugiere una disminución de la glicosilación de MUC5B [11].

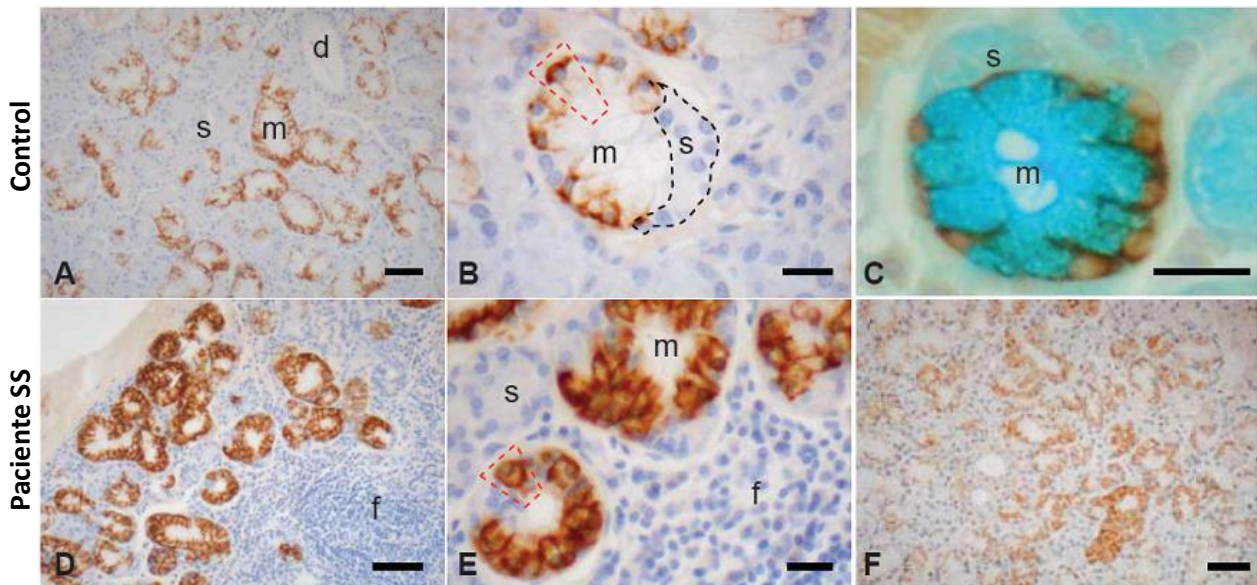


Figura 3. Localización de MUC5B en GSL de individuos controles (A-C) y pacientes con SS (D-F). A. Vista panorámica de corte de GSL que muestra a MUC5B en los acinos mucosos. B. MUC5B en la porción basal de las células acinares mucosas. C. Doble tinción MUC5B/Alcian blue. D. Región glandular cercana a foco de células inflamatorias. E. MUC5B en la región basal y apical de las células acinares mucosas. F. Región glandular lejana a foco de células inflamatorias. Imágenes representativas de datos obtenidos de 16 controles y 18 pacientes con SS. Barras: 100 μ m (A, D y F) y 20 μ m (B, C y E). m: acino mucoso; s: acino seroso. Los trapecios en B y E indican la polaridad apico-basal de una célula acinar (*Alliende y cols., 2008*).

Al hacer una cuantificación microdensitométrica de la intensidad de la tinción con Alcian blue pH 1,0, que identifica oligosacáridos sulfatados totales, se encontró una disminución significativa de la intensidad en acinos de GSLs de pacientes SS, con respecto a los controles ($p=0,04$). Estos resultados demuestran que las GSLs de pacientes con SS presentan una disminución de la sulfatación de las mucinas [11].

El residuo sulfatado sulfo-Lewis^a ($\text{SO}_3\text{-3Gal}\beta\text{1}\rightarrow\text{3}(\text{Fuc}\alpha\text{1}\rightarrow\text{4})\text{GlcNAc}$), se encuentra asociado exclusivamente al núcleo proteico de MUC5B en glándulas salivales [13]. Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que en las GSL de pacientes con SS hay una disminución en el contenido del residuo sulfo-Lewis^a, resultado corroborado por una disminución en el número de acinos mucosos positivos para este antígeno (Figuras 4 y 5) [11]. Estas observaciones fueron realizadas mediante Western blot de homogeneizados de GSL e inmunohistoquímica de cortes de GSL, utilizando el anticuerpo monoclonal F2 que reconoce específicamente el antígeno sulfo-Lewis^a. Para que ocurra el reconocimiento de este epítipo no es necesaria la asociación de una fucosa $\alpha\text{1-4}$ a la GlcNAc [19]. Al realizar una tinción secuencial de MUC5B y sulfo-Lewis^a observamos que algunos acinos mucosos presentan inmunotinción positiva sólo para MUC5B, mientras que acinos vecinos presentan inmunoreactividad tanto para MUC5B como para sulfo-Lewis^a (Figura 5D) [11].

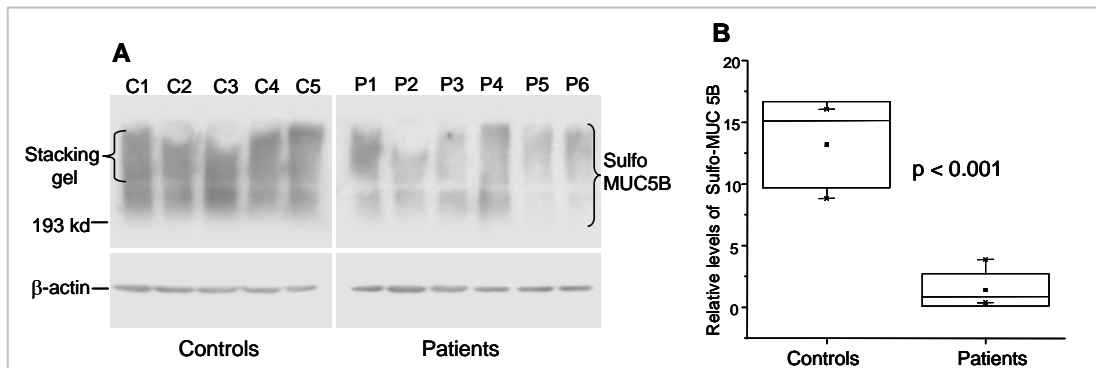


Figura 4. A. Niveles relativos de sulfo-Lewis^a presentes en MUC5B en 5 individuos controles (C1-C5) y 6 pacientes con SS (P1-P6). **B.** Comparación de los niveles relativos de sulfo-Lewis^a en controles y pacientes SS. El análisis estadístico arrojó un $p < 0,001$, considerado muy significativo (Tomado del original publicado por Allende y cols., 2008).

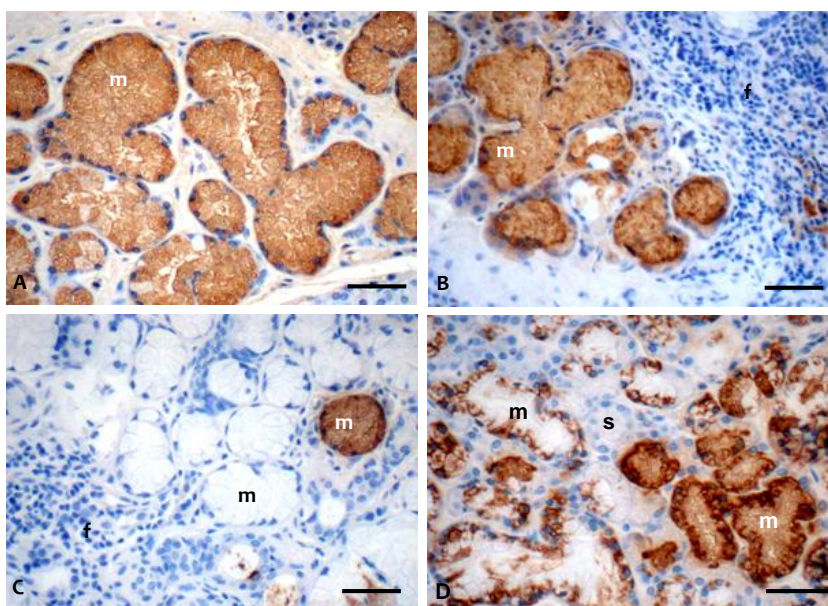


Figura 5. Localización del antígeno sulfo-Lewis^a en GSL de un individuo control (A) y pacientes con SS (B-D).

A. Corte de GSL inmunomarcado con el anticuerpo F2 anti sulfo-Lewis^a que muestra acinos mucosos (m) completamente teñidos. En **B** y **C** destaca la variación en la cantidad de acinos mucosos positivos para el antígeno sulfo-Lewis^a en cortes de GSL de pacientes con SS. **D.** Tinción secuencial para MUC5B (café oscuro) y sulfo-Lewis^a (café claro) en un corte de GSL de paciente con SS. f: foco de células inflamatorias. Las imágenes son representativas de datos obtenidos de 16 controles y 18 pacientes con SS. Barras 50µm. (Tomado del original, publicado por Alliende y cols., 2008).

Un hallazgo interesante es que la reducción del número de acinos mucosos inmunomarcados con el anticuerpo que reconoce al antígeno sulfo-Lewis^a es porcentualmente equivalente, tanto en pacientes que mantienen un flujo salival no estimulado normal (USF↑) ($\geq 1,5$ mL de saliva /15min), como en aquellos que lo tienen alterado (USF↓) (Figura 6) [11]. Saari y cols. describen que la cantidad de glicoproteínas poliméricas de alto peso molecular presentes en la saliva de los pacientes con SS tiene una correlación inversa con el flujo salival no estimulado. Esto podría ser explicado por un efecto de concentración al disminuir el flujo de agua y mantener constante los niveles de mucinas. Sin embargo, el contenido de proteínas totales de las muestras de salivas no presenta ningún tipo de correlación con el volumen del flujo salival, lo que reduce la posibilidad de que el aumento de estas mucinas sea por efecto de su concentración en un volumen menor de flujo [20].

Como se mencionó previamente, las mucinas mantienen la humectación de la superficie de las mucosas, ya que los grupos sialilados y sulfatados de los oligosacáridos asociados a su núcleo proteico retienen agua. En pacientes con SS la hiposulfatación de MUC5B podría

contribuir a la sensación de boca seca. Así, el volumen de agua no sería el único responsable de la sequedad oral, rompiendo un paradigma clásico en esta patología para explicar la xerostomía.

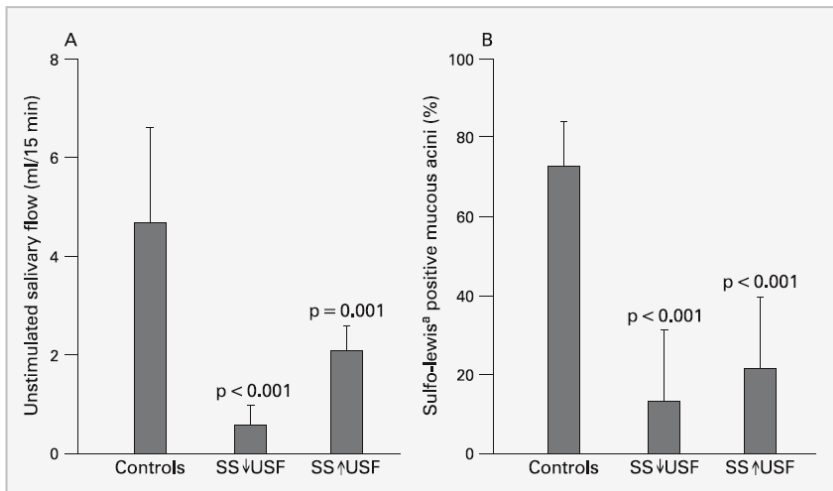


Figura 6. Relación entre número de acinos mucosos positivos para sulfo-Lewis^a y el flujo salival. A. Valores de flujo salival no estimulado (USF) en individuos controles y pacientes con SS que mantienen un flujo normal (USF↑) y pacientes con SS con flujo alterado (USF↓). **B.** Porcentaje de acinos mucosos positivos para sulfo-Lewis^a en controles y pacientes con SS (Tomado del original publicado por Alliende y cols., 2008).

Este cambio en los niveles de sulfatación se produce sin modificaciones en los niveles de mRNA y de proteína de MUC5B, lo que sugiere posibles alteraciones en las modificaciones post-traduccionales de la proteína en el complejo de Golgi [11].

Evidencias similares a las descritas en GSL de pacientes con SS, en que se observa una disminución en los niveles de sulfatación de las mucinas, han sido descritas en otras patologías. Los niveles de sulfatación se encuentran disminuidos en las mucinas de adenocarcinoma de colon con respecto a los niveles encontrados en mucosa normal. Mediante RT-PCR y ensayos enzimáticos *in vitro* se ha demostrado que tanto los niveles de mRNA de Gal3ST-2, como su actividad catalítica son más bajos en adenocarcinoma no mucinoso que en la mucosa normal, lo que podría explicar la hiposulfatación de las mucinas en esta patología [21].

4. Secreción de saliva en respuesta a estímulos

La secreción de saliva es una respuesta refleja a varios estímulos controlada por nervios simpáticos y parasimpáticos. El ritmo circadiano determina el volumen y la concentración de electrolitos de la saliva [12]. Otros factores que influyen en la composición y el volumen de saliva son la dieta y la edad, lo que determina una variación entre individuos y en un mismo individuo en diversas circunstancias [12].

Tanto la estimulación simpática como la parasimpática causan salivación, aunque la composición y el volumen de la saliva son diferentes, siendo más proteica la simpática y más acuosa la parasimpática [12]. Las glándulas serosas y seromucosas presentan inervación simpática y parasimpática y la secreción aumenta sinérgicamente cuando se estimulan ambas vías de inervación [12]. Los efectos de varios estímulos nerviosos sobre el volumen, la viscosidad, la concentración de proteínas y mucinas de la saliva secretada se resumen en la Tabla 1 [12].

Tabla 1. Características de la saliva dependiente del estímulo

Parámetro	Estímulo nervioso		
	Estimulación β -adrenérgica	Estimulación α -adrenérgica	Estimulación colinérgica
Volumen	Bajo	Bajo	Alto
Viscosidad	Alta	Baja	Baja
Concentración de proteínas	Alta	Alta	Baja
Concentración de mucinas	Muy alta	Baja	Muy baja

Modificada de Aps y cols., 2005

El modelo más estudiado es la secreción acuosa de saliva, por vía colinérgica, estimulada por acetilcolina. Este agonista se une a los receptores muscarínicos subtipo M3 localizados en la membrana plasmática basal de la célula acinar (Figura 7). La activación del receptor estimula la producción de inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3), el cual difunde por el citoplasma y se une a receptores de IP3 (IP3R) en el retículo endoplásmico activando la liberación de Ca^{2+} al citosol. El aumento del Ca^{2+} citosólico en la célula acinar activa la apertura de canales de Cl^- sensibles a Ca^{2+} en la membrana plasmática apical y de canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} en la membrana plasmática basolateral. El Cl^- , que se mantiene en equilibrio electroquímico por cotransporte dependiente de sodio, pasa desde la célula acinar al lumen del ducto. El Na^+ sigue al Cl^- y sale de la célula para mantener la neutralidad electroquímica y el consiguiente gradiente osmótico activa la apertura de los canales de agua, como aquaporina-5 y el agua sale al lumen [22].

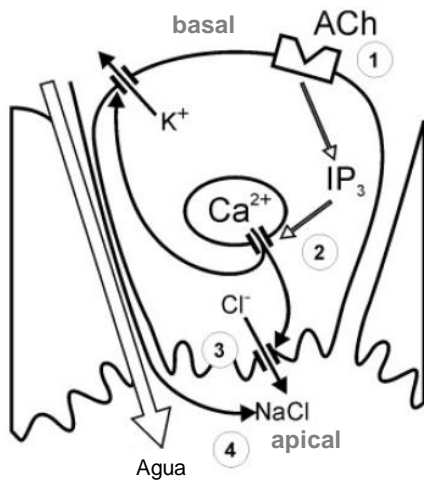


Figura 7. Modelo de secreción glandular estimulado por vía colinérgica. 1. Acetilcolina (ACh) se une al receptor muscarínico M3. 2. La activación del receptor estimula la producción 1,4,5-trifosfato (IP3), que difunde hacia el citosol y se une a los receptores de IP3 del retículo endoplásmico, causando la liberación de Ca²⁺ hacia el citosol. 3. El aumento de Ca²⁺ intracitosólico activa la apertura de canales de Cl⁻ y K⁺ sensibles a Ca²⁺ presentes en la membrana plasmática apical y basolateral, respectivamente. Para mantener el equilibrio electroquímico, el Cl⁻ sale de la célula seguido de Na⁺, mediante cotransporte. 4. El gradiente osmótico activa la salida de agua. *Modificada de Dawson y cols., 2006.*

En los pacientes con SS, la sequedad oral hace que deglutir los alimentos y hablar sean funciones difíciles de realizar y dolorosas, afectando fuertemente su calidad de vida.

Las principales estrategias terapéuticas en pacientes con SS emplean agonistas colinérgicos como pilocarpina o cevimeлина [4]. Ambos agentes se unen a los receptores muscarínicos subtipos M1 y M3 con distinta afinidad relativa. La activación de estos receptores, acoplados a proteína G, produce varios segundos mensajeros que no solo desempeñan un papel en la salida de agua, sino también en conversaciones cruzadas con receptores de citoquinas y factores de crecimiento [3].

Los tratamientos con agonistas parasimpáticos permiten aliviar, parcialmente, los síntomas en algunos pacientes con SS y limitar los efectos nocivos de la sequedad crónica de las mucosas. Su utilización incrementa el flujo salival por aumento del volumen de agua, pero como se mencionó anteriormente, si hay baja cantidad de mucinas o las mucinas carecen de los grupos sulfatados que capturan el agua, ésta no será retenida y los pacientes seguirán experimentando sequedad bucal.

5. Sulfatación de Mucinas

Entre los diversos factores responsables de la sulfatación de las mucinas salivales están las enzimas sulfotransferasas del complejo de Golgi, que transfieren grupos sulfatos desde un residuo sulfatado activo 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato (PAPS), que actúa como dador, a una posición definida de un oligosacárido específico. La sulfatación de los oligosacáridos de las mucinas ocurre más frecuentemente sobre residuos de galactosa (Gal) y N-acetilglucosamina

(GlcNAc), específicamente en el carbono 3 de Gal o en el carbono 6 de GlcNAc. Las enzimas que realizan esta transferencia de los grupos sulfatos son las Gal3-O-sulfotransferasas (Gal3ST) y GlcNAc6-sulfotransferasas (GlcNAc6ST), respectivamente. Estas sulfotransferasas asociadas a membrana actúan sobre los grupos hidroxilos y aminos de los azúcares. Mediante fraccionamiento subcelular se ha determinado que las sulfotransferasas que actúan sobre GlcNAc están localizadas en medial/trans-Golgi, mientras que las que actúan sobre Gal están ubicadas principalmente en trans-Golgi y TGN [16].

6. Sulfatación y Gal3-O-sulfotransferasas

El epítipo Lewis^a puede ser sulfatado en el carbono 3 de Gal, reacción catalizada por enzimas Gal3STs, generando como producto el residuo sulfo-Lewis^a: SO₃-3Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNAc.

A la fecha se han clonado cuatro miembros de la familia Gal3ST, basado en la similitud de sus secuencias con otras sulfotransferasas y con Gal3ST-1 que actúa sobre Gal-ceramida, Tabla 2 [21].

Tabla 2. Características de las Gal3-O-sulfotransferasas

	Gal3ST-1 (CST)	Gal3ST-2 (GP3ST)	Gal3ST-3 (Gal3ST2)	Gal3ST-4
Localización cromosómica	22q12	2q37.3	11q13	7q22
Número de aminoácidos	423	398	431	485
Distribución tisular	Ampliamente distribuída	Ampliamente distribuída	tiroides, cerebro, riñón, corazón, médula espinal	Ampliamente distribuída
Especificidad de sustrato	GalCer, LacCer, GalAAG	tipo 2, tipo 1, core 1	tipo 2, core 2, tipo 1*	core 1, core 2*, tipo 1*

*Actividad débil en relación a sus sustratos específicos. *Modificada de Seko y cols.,2002.*

Como se señala en la Tabla 2, las enzimas Gal3STs presentan distintas afinidades por sus sustratos aceptores. Las diferencias entre estos oligosacáridos están dadas principalmente por los monosacáridos que los forman y por la disposición de sus enlaces (Tabla 3).

Entre los diversos oligosacáridos asociados a las mucinas los residuos susceptibles de ser sulfatados en el carbono 3 de Gal son los de estructura core 1 y core 2 y los epítopos Lewis^a y Lewis^x, que corresponden a cadenas de tipo 1 y tipo 2, respectivamente (señalados en gris en la Tabla 3) [23].

Tabla 3. Estructura de los cores de oligosacáridos y epítopes antigénicos encontrados en las mucinas

Oligosacárido	Estructura
core	
antígeno Tn	GalNAc α Ser/Thr
antígeno Sialil-Tn	Sia α 2 \rightarrow 6GalNAc α Ser/Thr
core 1 o antígeno T	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α Ser/Thr
core 2	GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α Ser/Thr
core 3	GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc α Ser/Thr
core 4	GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1-3)GalNAc α Ser/Thr
core 5	GalNAc α 1 \rightarrow 3GalNAc α Ser/Thr
core 6	GlcNAc β 1 \rightarrow 6GalNAc α Ser/Thr
core 7	GalNAc α 1 \rightarrow 6GalNAc α Ser/Thr
core 8	Gal α 1 \rightarrow 3GalNAc α Ser/Thr
epítope	
O, H	Fuc α 1 \rightarrow 2Gal-
A	GalNAc α 1 \rightarrow 3(Fuc α 1 \rightarrow 2)Gal-
B	Gal α 1 \rightarrow 3(Fuc α 1 \rightarrow 2)Gal-
B linear	Gal α 1 \rightarrow 3Gal-
i	Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal-
l	Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3)Gal-
Sd(a), Cad	GalNAc β 1 \rightarrow 4(Sia α 2 \rightarrow 3)Gal-
Lewis ^a (Tipo 1)	Gal β 1 \rightarrow 3(Fuc α 1 \rightarrow 4)GlcNAc-
Lewis ^x (Tipo 2)	Gal β 1 \rightarrow 4(Fuc α 1 \rightarrow 3)GlcNAc-
sialyl-Lewis ^x	Sia α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4(Fuc α 1 \rightarrow 3)GlcNAc-
Lewis ^y	Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4(Fuc α 1 \rightarrow 3)GlcNAc-

(Modificada de Brockhausen y cols., 2009).

La sulfatación es la conjugación de un sustrato con un grupo sulfónico (SO₃⁻). Esta reacción ocurre en el citoplasma o al interior del complejo de Golgi. El co-sustrato 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato (PAPS), dona su grupo sulfónico (-SO₃⁻) a un sustrato aceptor (ROH). Los productos de esta reacción son 3'-fosfoadenosin 5'-fosfato (PAP) y el sulfoconjugado (ROSO₃⁻), (Figura 8) [24, 25].

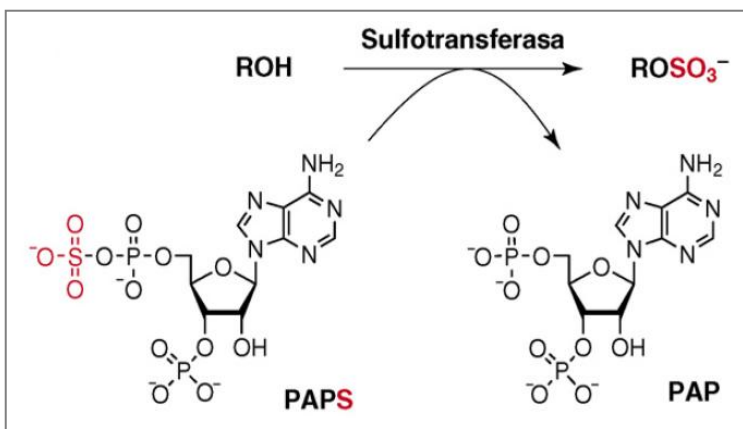


Figura 8. Reacción general de sulfotransferencia usando PAPS como sustrato dador. El grupo funcional hidroxilo (ROH) actúa como aceptor del grupo sulfónico donado por el PAPS, esta reacción es catalizada por una sulfotransferasa, generando un producto sulfatoconjugado (ROSO₃⁻) y el nucleótido 3'-fosfoadenosin 5'-fosfato (PAP). *Modificada de Bojarová y cols., 2008.*

La sulfatación depende de la presencia de un grupo funcional que actúa como aceptor del grupo sulfónico. El grupo aceptor más común es el hidroxilo presente en fenoles, alcoholes e hidroxilaminas y como producto de la reacción se obtienen ésteres sulfatos [26].

El proceso de sulfatación depende también de la concentración de sulfato inorgánico disponible intracelularmente. El sulfato en su forma inorgánica constituye el 90% del sulfato total del cuerpo, mientras que los sulfatoconjugados representan un 10%. El sulfato inorgánico es precursor de PAPS, la forma activada del sulfato y sustrato de las sulfotransferasas. La concentración de sulfato inorgánico intracelular depende de la actividad de sus transportadores de membrana y de la concentración de sulfato inorgánico extracelular [27].

Varios mecanismos mantienen la homeostasis de sulfato inorgánico, entre ellos se encuentra la oxidación de aminoácidos que contienen grupos sulfhidrilos (cisteína y metionina), absorción intestinal y re-absorción renal mediadas por transportadores, degradación de macromoléculas que contienen sulfatos y la actividad de enzimas sulfatasas [26].

La disponibilidad de PAPS para que ocurra la sulfatación depende de su síntesis, transporte, degradación y utilización. La concentración tisular de PAPS (4-80nmoles/g de tejido) es baja en relación a la cantidad de PAPS necesario para cubrir los requerimientos de la célula, lo que sugiere que su biosíntesis es elevada [26]. El PAPS es sintetizado en el citoplasma por una sintetasa bifuncional que posee actividad ATP-sulfurilasa y adenosín-fosfosulfato quinasa. El PAPS es trasladado desde el citoplasma al lumen del complejo de Golgi a través de transportadores específicos localizados en su membrana [28, 29]. Los transportadores de nucleótidos-azúcar (UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc y CMP-ácido siálico, entre otros) y de nucleótido-sulfato (PAPS), son proteínas con múltiples dominios de transmembrana que

homodimerizan en la membrana del complejo de Golgi. La energía necesaria para que ocurra la translocación de los nucleótidos-azúcar desde el citosol al lumen del Golgi es obtenida a partir del antitransporte del correspondiente nucleótido monofosfato [30].

El primer paso en la síntesis del PAPS combina ATP con sulfato inorgánico (SO_4^{2-}) para formar adenosín fosfosulfato (APS) y pirofosfato (PPi). Como se muestra a continuación, esta reacción es catalizada por ATP-sulfurilasa y ocurre en presencia de Mg^{2+} .



El paso siguiente combina el APS formado en el paso anterior con otra molécula de ATP para formar PAPS y ADP. Esta reacción es catalizada por adenosín fosfosulfato quinasa (APS-quinasa) y ocurre en presencia de Mg^{2+} [26].



El PAPS es degradado por dos vías diferentes, ambas llevan a la formación de 5'-AMP como producto final. Por una vía, PAPS es desulfatado por PAPS-sulfohidrolasa, formando PAP, el cual es defosforilado por una PAP-nucleotidasa para obtener 5'-AMP. En la segunda vía, PAPS es defosforilado por 3-nucleotidasa/PAPS-fosforilasa, formando APS, el cual es desulfatado por APS-sulfohidrolasa, formando 5'-AMP.

Alteraciones en la degradación del PAPS pueden influir en la sulfatación generando cambios en la disponibilidad de PAPS, o en los niveles de intermediarios de la degradación del PAPS: APS y PAP. Altas concentraciones de APS inhiben la actividad APS-quinasa y altos niveles de PAP inhiben las sulfotransferasas y compiten con el PAPS por los transportadores del complejo de Golgi [26].

Todas las sulfotransferasas son proteínas globulares compuestas por un dominio α/β , con cinco hojas β paralelas características que son flanqueadas a ambos lados por α -hélices [31]. Las características estructurales que constituyen en sitio catalítico y que son responsables de la interacción con el sustrato dador (PAPS) son conservados tanto en sulfotransferasas citosólicas, como en las asociadas a membrana [31]. Las sulfotransferasas residentes en el complejo de Golgi son proteínas con un único dominio de transmembrana, un corto fragmento citosólico N-terminal y un dominio catalítico C-terminal localizado en el lumen de las cisternas

del Golgi. Una región de longitud variable, el tallo, se extiende entre la membrana y el dominio catalítico [32].

Las sulfotransferasas reconocen diferencias en la estructura de los monosacáridos, configuración anomérica y enlaces del sustrato aceptor. Algunas sulfotransferasas actúan específicamente sobre un grupo de glicoconjugados: proteoglicanos, N-glicanos, O-glicanos y glicolípidos. Otras actúan sobre estructuras precursoras comunes a varios grupos, por ejemplo Gal3-O-sulfotransferasa-1 (Gal3ST-1, sulfotransferasa de cerebrósido) actúa exclusivamente sobre glicolípidos, mientras Gal-3-O-sulfotransferasa-2 (Gal3ST-2, GP3ST), actúa sobre N y O-glicanos [33].

Considerando estos antecedentes es posible plantear que la disminución del antígeno sulfo-Lewis^a asociado a MUC5B en GSL de pacientes con SS puede deberse a una disminución de los niveles de expresión o alteraciones en la actividad catalítica de las enzimas responsables de su síntesis. La enzima β 3-Galactosiltransferasa-5 es responsables de la síntesis de la cadena tipo I que constituye los antígenos sulfo-Lewis^a y sialil-Lewis^a. Estudios preliminares de nuestro laboratorio utilizando el anticuerpo E-9, anti sialil-Lewis^a, en Western blot de homogenizados de GSL, han mostrado que los niveles del residuo sialil-Lewis^a de MUC5B son semejantes entre individuos controles y pacientes con SS, lo que indicaría que las enzimas que sintetizan la cadena de tipo I aparentemente no presentarían variaciones en sus niveles de expresión o actividad.

Esto deja a las enzimas responsables de la sulfatación del residuo Lewis^a como principal blanco de estudio de posibles alteraciones que pudiesen explicar la hiposulfatación de MUC5B en pacientes con SS.

HIPÓTESIS

En glándulas salivales labiales de pacientes con SS existe una disminución en los niveles de expresión y/o actividad catalítica de sulfotransferasas responsables de la sulfatación de MUC5B.

OBJETIVO GENERAL

Determinar cambios en la expresión y/o actividad de Gal3-O-sulfotransferasas que pudieran estar involucradas en la disminución de la sulfatación de MUC5B en glándulas salivales labiales de pacientes con SS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En extractos de glándulas salivales labiales de pacientes con SS primario e individuos controles se procedió a:

1. Determinar los niveles de mRNA de Gal3STs 2, 3, 4 y de β 3-Galactosiltransferasa 5.
2. Determinar los niveles de proteínas de Gal3STs 2, 4 y de β 3-Galactosiltransferasa 5.
3. Cuantificar la actividad enzimática de Gal3-O-sulfotransferasas y sialiltransferasas.
4. Cuantificar la actividad enzimática de glicosiltransferasas involucradas en la síntesis y extensión de oligosacáridos asociados al núcleo proteico de las mucinas.

1. Pacientes SS e Individuos controles

Se utilizaron GSL de 31 pacientes con SSp, diagnosticados de acuerdo al criterio de consenso Americano/Europeo del año 2002 [34], que considera: I. Síntomas oculares; II. Síntomas orales; III. Evidencia objetiva de daño ocular; IV. Score de foco ≥ 1 en la biopsia de GSL (foco: acumulación de más de 50 células inflamatorias mononucleares en posición periductal); V. Evidencia objetiva de compromiso de las GS y VI. Detección de autoanticuerpos antiribonucleoproteínas Ro/SSA y/o La/SSB. El diagnóstico de SS se establece cuando se presentan 4 de estos 6 parámetros, siempre que la biopsia o la serología sean positivas y también cuando están presentes 3 de los 4 parámetros objetivos de compromiso glandular.

Como control se utilizaron GSL de 31 individuos cuyas biopsias no presentaron infiltrado linfocitario o presentaron infiltrado linfocitario leve (sialoadenitis crónica leve a moderada), parénquima glandular bien conservado y sin signos de SS.

Los datos demográficos, serológicos e histológicos de los individuos incluidos en este estudio se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Características demográficas, serológicas e histológicas de los individuos controles y pacientes SS

Parámetro	Controles	Pacientes SS
Número de individuos (n)	31	31
Sexo (mujeres / hombres)	27/4	29/2
Edad (años), promedio \pm DE, (rango)	42 \pm 11 (20-60)	46 \pm 12 (22-70)
FSNE, promedio \pm DE mL/15 minutos (rango)	3,1 \pm 1,7 (0,6-6)	1,1 \pm 1,4 (0- 4,5)*
Score Foco, n° de focos/4 mm ² de tejido	0	1(n=19), \leq 3(n=5), \geq 4(n=7)
Autoanticuerpos Ro	0	24/31
Autoanticuerpos Ro-La	0	15/31
Autoanticuerpos antinucleares	1/31	27/31
Factor Reumatoideo	0	10/31

FSNE: flujo salival no estimulado; DE: desviación estándar; * $p < 0,0001$.

La metodología empleada en este trabajo está aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

2. Obtención de glándulas salivales labiales

Las GSL se obtuvieron mediante la técnica operatoria descrita por Daniels [35]. Bajo anestesia local infiltrativa, se realizó una incisión de 1,5 a 2cm de longitud en la cara interna del labio inferior, paralelo al borde bermellón y lateral a la línea media. Después, se llevó a cabo la disección roma de los márgenes de la incisión y a continuación se extrajeron las glándulas salivales. Finalmente, los bordes se suturaron con seda 3-0, la cual se retiró al cabo de 7-10 días. Las glándulas se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C para las posteriores determinaciones de los niveles de mRNA, de proteínas y actividad enzimática. Las GSLs se obtuvieron luego del consentimiento informado de los pacientes.

3. Determinación de los niveles relativos de mRNA

3.1. Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó empleando el método de extracción por afinidad en columnas de sílica-gel RNeasy (Qiagen, Standford, EEUU), según las indicaciones del fabricante. Glándulas de un peso húmedo ~10mg se colocaron en un mortero de porcelana con un volumen de 10mL de N₂ líquido, al alcanzar un volumen mínimo de nitrógeno la glándula se pulverizó haciendo presión con un pistilo, luego se agregaron 600µL de tampón de lisis RLT (composición protegida por patente N° 5.234.809, RNeasy Mini Kit, Qiagen, Standford, EEUU) conteniendo β-mercaptoetanol al 1%. Inmediatamente, se traspasó el producto de lisis a un homogeneizador vidrio/vidrio y se succionó 5 veces con una jeringa desechable de 1mL (tuberculina). Para completar la homogeneización, el producto de lisis se colocó en la columna QIAshredder (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Standford, EEUU) y se centrifugó durante 2 minutos a velocidad máxima (12.000rpm en centrifuga: Centrifuge 5415 C, radio 7,3cm, Eppendorf, EEUU). El sobrenadante obtenido (~ 600µL) se recuperó en un tubo Eppendorf y se le agregaron 600µL de etanol al 70% con objeto de aumentar la afinidad y favorecer la unión selectiva del RNA a la columna de afinidad (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Standford, EEUU). Se mezcló por pipeteo y se agregaron volúmenes máximos de 700µL de ésta solución a la columna de afinidad RNeasy. Esta operación se repitió hasta filtrar todo el volumen del homogeneizado y se centrifugó cada vez durante 15 segundos a 12.000rpm. El RNA unido a la membrana de sílica se lavó con 350µL de tampón RW1 (tampón RW1 RNeasy Mini Kit, composición protegida por patente N° 5.234.809,

Qiagen, Standford, EEUU) y se esperó 5 minutos para luego centrifugar durante 15 segundos a velocidad máxima.

Para eliminar el DNA genómico, se realizó un tratamiento con DNAsa, donde se adicionaron 80µL de una mezcla de digestión que contiene 10µL de DNasa I más 70µL de tampón RDD (Qiagen, Standford, EEUU). La mezcla de digestión se agregó en el centro de la membrana y se incubó durante 45 minutos a 25°C. Luego se agregó a la membrana 350µL de tampón RW1 y se centrifugó durante 15 segundos a 12.000rpm descartando el eluído. Posteriormente la membrana se incubó con 500µL de tampón RPE (composición protegida por patente Nº 5234809, EEUU) con etanol al 70% (Stock: 11mL de tampón RPE + 44mL de etanol al 70%), y se centrifugó 2 veces durante 2 minutos a 12.000rpm. Una vez seca la membrana, se procedió a eluir el RNA en dos pasos consecutivos con 15µL de H₂O libre de ribonucleasas cada vez.

La concentración y pureza del RNA se determinó midiendo la absorbancia de cada muestra (dilución 1:200) a 260 y 280nm y calculando la relación 260/280. En todos los experimentos se utilizaron las muestras que presentaron una relación de 1.5 a 2.0. La concentración de RNA se determinó empleando la absorbancia a 260nm y utilizando la regla de conversión convencional donde la $[RNA] = 200 (\text{Factor de dilución}) \times (\text{Abs. } 260\text{nm}) \times 40 (\mu\text{g/mL})$ [36]. La concentración de RNA total se expresó en µg/µL.

Todas las soluciones y materiales utilizados fueron previamente tratados con dietil-pirocarbonato (DEPC) y autoclavados para inactivar las ribonucleasas.

3.2 Electroforesis de RNA en gel denaturante

Con el propósito de verificar la integridad del RNA extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y formaldehído al 8% (v/v) en tampón MOPS (MOPS 0,2M; acetato de sodio 0,05M; EDTA 1mM; pH 8,0).

Las muestras se prepararon con 1µg de RNA total y el volumen necesario de tampón de carga RNA 6X (azul de bromofenol 0,04% p/v; xileno cianol 0,04% p/v; formaldehído 6% v/v; formamida 40% v/v; glicerol 3% v/v; bromuro de etidio 0,1µg/µL en tampón MOPS, pH 8,0) para completar 8µL. Las muestras se incubaron a 72°C durante 5 minutos y se enfriaron rápidamente en hielo. Luego se realizó la separación electroforética a 110V por 40 minutos, con tampón de

corrida MOPS 1X. Los geles se fotografiaron en un transiluminador UV (FBTIV-816 Fisher Scientific), empleando una cámara Nikon coolpix 4300.

3.3 Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir de 3µg de RNA total, utilizando el kit comercial SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen Corporation, EEUU). La mezcla de incubación contiene: 1µL de RNAsa out (Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen Corporation, EEUU), 0,5µL de oligo (dT) (Promega, Madison, WI, EEUU), 0,5µL de random primer (Promega, Madison, WI, EEUU), 3µg de RNA total y un volumen de agua libre de ribonucleasas adecuada para llegar a un volumen de 12µL finales, esta solución se calentó a 70°C por 10 minutos, luego se enfrió rápidamente en hielo y se centrifugó por 10 segundos. Consecutivamente, se agregaron 4µL de tampón 5X (Tris-HCl 250mM; pH 8,3; KCl 375mM, MgCl₂ 15mM), 2µL de DTT 0,1M y 1µL de dNTPs 10mM (Promega, Madison, WI, EEUU), se mezcló suavemente y se calentó a 42°C por 2 minutos. Se agregó la enzima Super Script II (200U/µL) mezclando por pipeteo y se incubó a 42°C durante 60 minutos, luego la reacción se terminó incubando a 70°C por 15 minutos.

3.4 Diseño de partidores específicos

Para las reacciones de PCR en tiempo real, se diseñaron partidores para cada gen en estudio, considerando que fueran específicos, no organizaran estructuras secundarias ni formaran dímeros (Integrated DNA Technologies, Fermelo SA). Se utilizaron las secuencias de los genes disponibles en GenBank (NCBI, NIH) y se diseñaron los partidores utilizando el programa AmplifX 1.4 (Institut Jean Roche, Francia). Las características de los pares de partidores utilizados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de los partidores

Gen	GenID	Número de acceso (GenBank®)	Orientación	Secuencia	Tamaño del producto
h18S	6222	NM_022551.2	sentido	5'-GATATGCTCATGTGGTGTG-3'	236 pb
			antisentido	5'-AATCTTCTTCAGTCGCTCCA-3'	
Gal3st-2	64090	NM_022134.2	sentido	5'-CAGAGATACTCCGGGTCAT-3'	198pb
			antisentido	5'-GAAGCGGTAGAGGATGTTGA-3'	
Gal3st-3	89792	NM_033036.2	sentido	5'-ACCGTAAGCCTTCTCATCCA-3'	178pb
			antisentido	5'-CGGCAAAGCGAAACAGGAT-3'	
Gal3st-4	79690	NM_024637.4	sentido	5'-CATGACCATTGGCTTGCAC-3'	165pb
			antisentido	5'-CTGCTCCCGATTATGTGT-3'	
β3-GalT-5	10317	NM_033172.	sentido	5'-ATCAGGCAGCCATTAGCAA-3'	100pb
			antisentido	5'-ACGTCGCCAGAAAACACGTA-3'	

3.5 PCR en Tiempo Real

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20µL, utilizando el kit Brilliant II Sybr®Green QPCR Master Mix (Stratagene, EEUU) y en un termociclador modelo MxPro-Mx 3000P (Stratagene, EEUU). La mezcla principal viene a una concentración 2X y está formado por la enzima SureStart® Taq polimerasa, Sybr Green® I Dye, MgCl₂ 2,5mM y dNTPs, esta se mezcló con los partidores a la concentración necesaria y agua para alcanzar una concentración 1X.

Para la amplificación se empleó un protocolo (recomendado por el fabricante) con 10 minutos de denaturación inicial a 95°C para activar la enzima y 35 ciclos consecutivos de 15 segundos de denaturación a 95°C, 15 segundos de apareamiento a la temperatura óptima de los partidores y 15 segundos a 72°C para la elongación. Para obtener la curva de disociación se agregó al final de la reacción de PCR, un ciclo adicional, en donde las muestras se denataron durante 10 segundos a 95°C, se hibridaron a 70°C durante 1 segundo y durante 10 minutos se realizó un aumento gradual de la temperatura (0,02°C por segundo) hasta alcanzar los 95°C. La finalidad de la aplicación de un gradiente de temperatura creciente, es evaluar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados y determinar la T_m (temperatura de *melting*) de los amplicones para comprobar su especificidad. Esta T_m debe corresponder a una curva con un único máximo, que es específico para cada producto génico.

3.6 Análisis de los datos

Los niveles de mRNA de cada gen de interés se analizaron por cuantificación relativa a la cantidad de mRNA del gen de expresión constitutiva h18S en cada muestra. La eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real para cada par de partidores, se estableció a partir de una curva estándar, utilizando diluciones seriadas de cDNA obtenido de GSL de un individuo control. Se realizó la amplificación del gen de referencia y del gen de interés con el fin de obtener muestras enriquecidas con cada producto. Se realizaron diluciones seriadas del producto enriquecido por un factor de 10 en KCl al 0,001% (p/v) y se realizó un PCR en tiempo real, del cual se obtuvieron los valores de Ct que permiten calcular la eficiencia (E) de la reacción. Ct corresponde al número de ciclo en el cual la fluorescencia detectada es significativamente mayor al *background*, este valor es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias del gen. La eficiencia de la reacción ($E=10^{(-1/\text{pendiente de la curva estándar})}$), se consideró máxima (100%) si todo el cDNA blanco disponible se duplica en un ciclo de amplificación, en cuyo caso el valor exponencial de E es 2,0. En la cuantificación relativa de las muestras se utilizó la fórmula de Pfaffl [37].

$$\text{Razón de expresión} = \frac{E_{\text{gen de interés}}^{\Delta Ct (\bar{x} \text{ grupo control} - \bar{x} \text{ grupo de pacientes SS})}}{E_{\text{gen de referencia}}^{\Delta Ct (\bar{x} \text{ grupo control} - \bar{x} \text{ grupo de pacientes SS})}}$$

Cuando la razón es igual a uno, significa que no existen cambios en la expresión del gen de interés en el grupo de pacientes respecto al grupo control. Un valor por encima de uno, refleja sobre-expresión y por debajo del mismo indica disminución en la expresión relativa del gen de interés.

Cada individuo se analizó en duplicado para el gen de expresión constitutiva h18S y para el gen de interés. Para descartar una posible contaminación externa de la mezcla de reacción que pudiese aumentar inespecíficamente la fluorescencia registrada por el equipo, se utilizó un control negativo sin templado (NTC: *No Template Control*) y para descartar contaminación del mRNA con DNA genómico se utilizó un control con RNA como templado (No RT: *No Reverse Transcription Control*). El análisis estadístico fue realizado usando el programa REST 2008 (Relative Expression Software Tool) de Corbett Research y M. Pfaffl.

4. Determinación de los niveles relativos de proteínas

4.1 Extracción de proteínas

Las GSlS se homogeneizaron en tampón de extracción RIPA (Tris-HCl 50mM, Tritón X-100 1%; NaCl 150mM; SDS 0,1%, EGTA 5mM, Deoxicolato de sodio 1%, pH 7,4) con inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, benzamidina 10µg/mL, aprotinina 10µg/mL, leupeptina 10µg/mL y Na₃VO₄ 1mM). Las GSlS se pulverizaron en un mortero con N₂ líquido. Luego se continuó la homogeneización en un homogeneizador vidrio-vidrio y el lisado se succionó 5 veces con una jeringa desechable de 1mL (tuberculina). Posteriormente, el homogeneizado se sometió a tres ciclos de congelamiento/descongelamiento y se centrifugó a 12.000 rpm (Centrífuga Hettich, modelo Universal 32R, Tuttlingen, Germany) durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se utilizó para cuantificar proteínas, y posteriormente se guardaron alícuotas a -80°C.

4.2 Cuantificación de proteínas

Se empleó el método de Bradford [38]. Se incubaron diluciones seriadas del extracto de proteínas con el reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc.) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia de las muestras a 595nm en un espectrofotómetro de doble haz (Shimadzu UV-160A). La curva de calibración se realizó utilizando albúmina de suero bovino. El método estándar permite determinar concentraciones entre 0,2 a 1,4mg/mL y el micrométodo entre 1,25 y 25 µg/mL.

4.3 Preparación de las muestras

Se diluyeron 15-20µg de proteínas en relación 1:1 con tampón de carga 2X (Tris-HCl 0,06M, SDS 2%(p/v), glicerol 14% (v/v), azul de bromofenol 0,02%, β-mercaptoetanol 5%, pH 6,8). Posteriormente, se efectuó un calentamiento de las muestras a 100°C, durante 3 minutos.

4.4 Separación electroforética de proteínas

Las muestras de proteínas se depositaron dentro de los bolsillos del gel concentrador (gel de acrilamida al 5%). La separación electroforética se inició con la aplicación de 24mA de corriente continua hasta que el azul de bromofenol alcanzó el gel separador (gel de acrilamida al

8%). A partir de ese punto, la separación de las proteínas se realizó aplicando 60mA de corriente continua.

4.5 Western blot

Las proteínas de las muestras se separaron mediante electroforesis denaturante y reductora. Luego se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa, empleando tampón de transferencia (Tris 20mM, Glicina 154mM, metanol 20%) y aplicando corriente continua de 60mA, durante 15 horas a 4°C.

Después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se lavaron en tampón TBS-T (Tris-HCl 10mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,1% (v/v), pH 7,4) y se bloquearon durante 1 hora con leche libre de grasas y de proteasas (5-13%p/v), disuelta en el mismo tampón (solución de bloqueo). Las características de los anticuerpos primarios utilizados se resumen en la Tabla 6. Se utilizaron anticuerpos secundarios Anti IgG (H+L) ratón o conejo, conjugados con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA). El revelado se realizó por quimioluminiscencia usando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, (Pierce protein research products de Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) y utilizando películas Kodak (BioMax Light Film, Scientific Imaging Film, Francia).

La intensidad de las bandas de 3 experimentos independientes se midió por densitometría (UN-USI ScanIT gel Automated digitalizing, system versión 4.1, para Windows copyright© 1996, Silk Scientific Corporation, Orem Utah, USA). Los niveles de expresión se normalizaron en relación a la expresión de β -actina.

Tabla 6. Características de los anticuerpos primarios

Anticuerpo	Origen	Inmunógeno	Empresa
Anti Gal3ST-2 (no comercial)	conejo	Péptido CELGPRRLRGEVERL conjugado a KLH	Fabricado por GenScript, Piscataway, NJ, USA
Anti Gal3ST-4	ratón	Gal3ST-4 completa de origen humano	NOVUS Biologicals, Littleton, CO, USA
Anti β 3GalT-5 (no comercial) Clon 6F8	ratón	β 3GalT-5 humana	Fabricado y donado por la Dra. Ulla Mandel. Copenhagen Center for Glycomics (CCG)
Anti β -actina Clon C4	ratón	Actina de molleja de pollo	MP Biomedicals, Solon, OH, USA

KLH: keyhole limpet hemocyanin

5. Determinación de los niveles de actividad enzimática de Gal3-O-sulfotransferasas en glándulas salivales labiales humanas.

5.1 Obtención de los homogeneizados

GSLs (0,5–1,0g), previamente congeladas a -80°C , se lavaron tres veces en NaCl 0,9%p/v, posteriormente se sumergieron en aproximadamente 3mL de sacarosa 0,25M en PBS (5 veces el volumen de tejido glandular), se homogeneizó utilizando un homogeneizador vidrio/vidrio y se almacenó a -80°C hasta su utilización [39]. La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford [38].

5.2 Estandarización de las condiciones óptimas del ensayo enzimático Gal3-O-sulfotransferasa.

Se usó una mezcla de reacción para un volumen final de $40\mu\text{L}$, que contiene 2mM de sustrato aceptor, PAP[^{35}S] (993 cpm/pmol) $6,5\mu\text{M}$, ATP 2mM, Tritón X-100 0,1%, 2-mercaptopropanol 10mM, MES 50mM pH 7,0, NaF 10mM, MnCl_2 10mM y $10\mu\text{L}$ de homogeneizado de tejido preparado en sacarosa 0,25M (70-85 μg de proteína). Se incubó por 1 hora a 37°C en un baño termoregulado y se agregó $700\mu\text{L}$ de agua fría para detener la reacción.

Se probaron varios sustratos aceptores de estructura core 1 para determinar cuál de ellos permite obtener una mejor separación y purificación del producto formado. Cada uno de estos sustratos presenta modificaciones relacionadas con su capacidad de quedar retenido en columnas de afinidad de fase reversa. Se probó Gal β (1 \rightarrow 3)-GalNac α -benzol (GGA-Bn), Gal β (1 \rightarrow 3)-GalNac α -metoxi-carbonil-octil (GGA-mco) y Gal β (1 \rightarrow 3)(6-deoxi)-GalNac α -benzol (G(6-deoxi)GA-Bn). Estos sustratos se probaron a una concentración de 2mM, utilizando como fuente de sulfotransferasas $160\mu\text{g}$ de homogeneizado de colon de rata, tejido que presenta una gran actividad catalítica de estas enzimas. El producto obtenido se purificó por cromatografía en fase reversa. Utilizando una jeringa de 1mL se aplicó la mezcla de reacción con un flujo aproximado de 2mL/minuto sobre un cartridge C18 Sep-Pak® (Waters Corp. Milford, Massachusetts, USA), que está constituido por una sílica hidrofóbica que retiene compuestos no polares. El cartridge se lavó 2 veces con 1mL de agua destilada y se recolectó la primera fracción (A), que contiene gran parte los componentes polares de la reacción, tales como: el sustrato dador (PAP[^{35}S]), [^{35}S] libre, PAP libre, productos y sustratos endógenos como proteínas,

mucinas, etc. Luego, el cartridge se lavó 4 veces con 1mL de agua y se recolectaron las fracciones B, C, D y E. Finalmente, se procedió a eluir los compuestos hidrofóbicos lavando el cartridge 5 veces con 1mL de metanol y se recolectaron las fracciones F, G, H, I y J. A la mitad del volumen obtenido en las fracciones eluidas (500 μ L), se agregó 4,5mL de líquido de centelleo (Ready safe cocktail Beckman Coulter, USA) y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo multipropósito (modelo LS6500 Beckman Coulter, USA).

El sustrato Gal β (1 \rightarrow 3)(6-deoxi)-GalNAc α -benzol presentó la mejor afinidad por la sílica hidrofóbica. El producto se observó como un pico de radiactividad (cpm) en las fracciones F y G (Figura 9), el metanol utilizado para eluir compite con las especies hidrofóbicas, permitiendo su liberación desde la sílica. En estas fracciones también se obtuvo el sustrato remanente de la reacción.

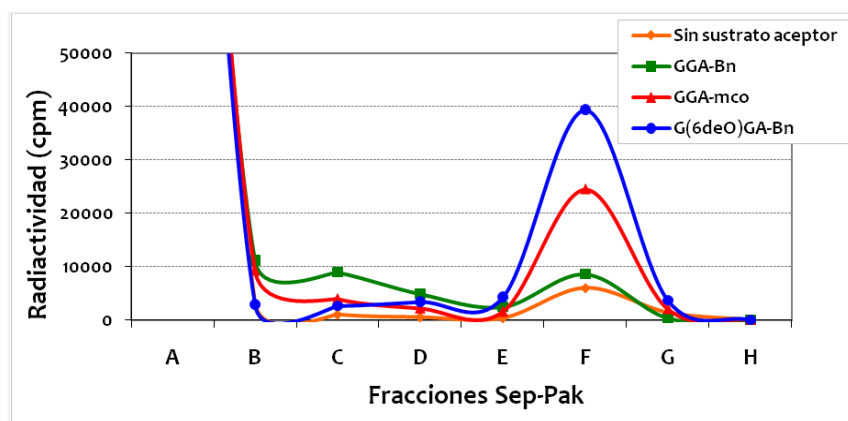


Figura 9. Comparación de la eficiencia de retención y elución del producto de la reacción Gal3-O-sulfotransferasa en cromatografía de fase reversa SepPak usando diferentes sustratos aceptores. Fracciones A, B, C, D y E lavadas con agua, Fracciones F, G y H eluidas con metanol.

Para asegurar la pureza del producto a cuantificar se mezclaron las fracciones F-G obtenidas en la cromatografía de fase reversa y se concentraron en un evaporador (Büchi, Zwitterland). La mezcla fue resuspendida en 120 μ L de agua y se procedió a separar los componentes por cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna de fase reversa C18 con una relación de acetonitrilo:agua de 12:88, lo que da un tiempo de retención del estándar Gal β (1 \rightarrow 3)-GalNAc- α -benzol de 24 minutos. Se recolectaron 13 fracciones con un flujo de 2mL/minuto por tubo. La carga negativa que presenta el producto formado lo hace menos hidrofóbico, lo que hace que eluya antes que el sustrato aceptor, permitiendo su separación. Se cuantificó la radiactividad como se especificó previamente. El producto se observó como un pico de radiactividad (cpm) que aparece en las fracciones 9 a 11.

5.3 Determinación de los niveles de actividad enzimática de Gal3-O-sulfotransferasas.

Se realizaron ensayos enzimáticos Gal3-O-sulfotransferasa de acuerdo a las condiciones señaladas anteriormente, utilizando como fuente de enzimas homogeneizados de GSLs de pacientes SS (n=7) e individuos controles (n=10) y como sustrato aceptor Gal β 1 \rightarrow 3(6-deoxi)GalNAc α -benzol 2mM. Por cada muestra se realizaron dos ensayos exógenos y un ensayo endógeno (sin sustrato aceptor). El cálculo de la actividad se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad}(\text{pmoles/hora} \times \text{mg de proteína}) = \frac{\bar{x} \text{ cpm ensayos exógenos} - \text{cpm ensayo endógeno}}{\text{cpm/pmol PAP} [^{35}\text{S}] \times \text{tiempo de incubación} \times \text{mg proteína}}$$

6. Determinación de los niveles de actividad enzimática de sialiltransferasas en glándulas salivales labiales humanas.

Tanto la sulfatación, como la sialilación de los oligosacáridos del núcleo proteico de las mucinas, contribuyen a aumentar las cargas negativas y a favorecer la retención de moléculas de agua. Ambas modificaciones postraduccionales ocurren en el complejo de Golgi. En este trabajo comparamos también los niveles de actividad enzimática de sialiltransferasas, que presentan afinidad por el mismo sustrato aceptor analizado en el ensayo de actividad sulfotransferasa. En la extensión del oligosacárido en el complejo de Golgi, ambos tipos de enzimas compiten por los mismos sustratos para adicionar el residuo final.

Se usó una mezcla de reacción para un volumen de 40 μ L que contiene 1mM de sustrato aceptor Gal β 1 \rightarrow 3(6-deoxi)GalNAc-benzol, CMP- ácido siálico [^3H] (1545cpm/nmol) 7,9mM, Tritón X-100 0,125%, TRIS-HCl 100mM pH 7,0, MnCl $_2$ 5mM y 10 μ L de homogeneizado (70-85 μ g de proteína). La mezcla se incubó por 1hora a 37°C en un baño termoregulado, para detener la reacción se agregó 700 μ L de agua fría. El producto fue separado de los demás componentes de la reacción por cromatografía de fase reversa de la misma manera que se describió anteriormente, pero en este caso se cuantificó la radiactividad del total del volumen colectado en cada fracción. Tanto el ensayo exógeno como el endógeno (sin sustrato aceptor) se realizaron en duplicado.

7. Determinación de la actividad de glicosiltransferasas involucradas en la síntesis y extensión de oligosacáridos complejos en glándulas salivales labiales humanas.

En el proceso de O-glicosilación de mucinas participan diversas glicosiltransferasas que actúan secuencialmente para extender las cadenas de oligosacáridos. En la Figura 10 se muestran los principales pasos de la vía de síntesis y extensión de oligosacáridos y las enzimas involucradas en cada reacción.

7.1. Reacción polipéptido GalNAc transferasa.

Se usó una mezcla de reacción para un volumen final de 40 μ L que contiene 0,2 mM de sustrato aceptor oligopéptido AQPTPPP, AMP 10mM, MES 125 mM, pH 7,0, Tritón X-100 0,125%, MnCl₂ 10mM, UDP GalNAc[³H] (3795cpm/nmol) 0,91mM, 10 μ L de homogeneizado (70-85 μ g de proteína). La mezcla se incubó por 1 hora a 37°C en un baño termoregulado, para detener la reacción se agregó 600 μ L de agua fría. El producto fue separado en una resina de intercambio aniónico AG1X8 BioRad. Posteriormente, la resina se lavó 2 veces con 600 μ L de agua y el total del volumen fue colectado en tubos de vidrio de tapa rosca para ser liofilizados toda la noche. El producto liofilizado fue resuspendido en 120 μ L de agua y se analizó en una cromatografía líquida de alta resolución, utilizando una relación acetonitrilo:agua de 6:94 y un tiempo de retención del sustrato aceptor de 20 minutos. Se colectaron 15 fracciones con un flujo de 2mL/minuto por tubo. La radiactividad fue cuantificada como se explicitó previamente.

7.2. Reacción Galactosil transferasa (core 1, β 3 y β 4 Gal transferasas).

Se usó una mezcla de reacción para un volumen final de 40 μ L que contiene 1mM de sustrato aceptor GalNAc α -Benzol (core 1 Gal transferasa) o GlcNAc β -Benzol (β 3 y β 4 Gal transferasa), UDP-Gal[³H] (6082 cpm/nmol) 1 mM, Tritón X-100 0,125%, MES 125 mM, pH 7,0, MnCl₂ 10 mM, AMP 10 mM, γ -galactonolactona 5mM, 10 μ L de homogeneizado (70-85 μ g de proteína).

La mezcla se incubó por 1 hora a 37°C en un baño termoregulado, para detener la reacción se agregó 600 μ L de agua fría. El producto fue separado en una resina de intercambio aniónico AG1X8 BioRad y posteriormente por cromatografía líquida de alta resolución. Se utilizó una relación acetonitrilo:agua de 13:87 para los productos de la reacción core 1 Gal transferasa

y 12:88 para los productos de la reacción β 3 y β 4 Gal transferasa, con tiempos de retención de los sustratos aceptores de 24 y 20 minutos, respectivamente. Se colectaron 15 fracciones y se cuantificó la radiactividad de la manera señalada anteriormente.

7.3. Reacción GlcNAc transferasa.

Se usó una mezcla de reacción GlcNAc transferasa (core 2 GlcNAc transferasa) para un volumen final de 40 μ L, que contiene 2mM de sustrato aceptor Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc- α -Benzol, UDP-GlcNAc[3 H] (1624 cpm/nmol) 0,91mM, Tritón X-100 0,125%, MES 125mM, pH 7,0, GlcNAc 125mM, AMP 10mM, β -mercaptoetanol 0,2mM, MnCl $_2$ 10 mM, 10 μ L de homogeneizado (70-85 μ g de proteína).

La mezcla se incubó por 1 hora a 37°C en un baño termoregulado, para detener la reacción se agregó 600 μ L de agua fría. El producto fue separado en una resina de intercambio aniónico AG1X8 BioRad y posteriormente por cromatografía líquida de alta resolución, utilizando una relación acetonitrilo:agua de 12:88 con un tiempo de retención del sustrato aceptor de 19 minutos. La cuantificación de la radiactividad se realizó de la manera descrita.

8. Análisis estadístico

Considerando el tamaño de la muestra y el tipo de variable a analizar se empleó el test no paramétrico de Mann-Whitney para determinar si existían diferencias significativas entre los promedios de las mediciones del grupo control y los pacientes SS. Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Para determinar si existía una asociación entre los resultados de actividad enzimática y los niveles relativos de proteína obtenidos para cada individuo, se usó el test de correlación de Spearman. El coeficiente (r) obtenido oscila entre -1 y 1, indicando asociación negativa o positiva, y el 0 indica no correlación.

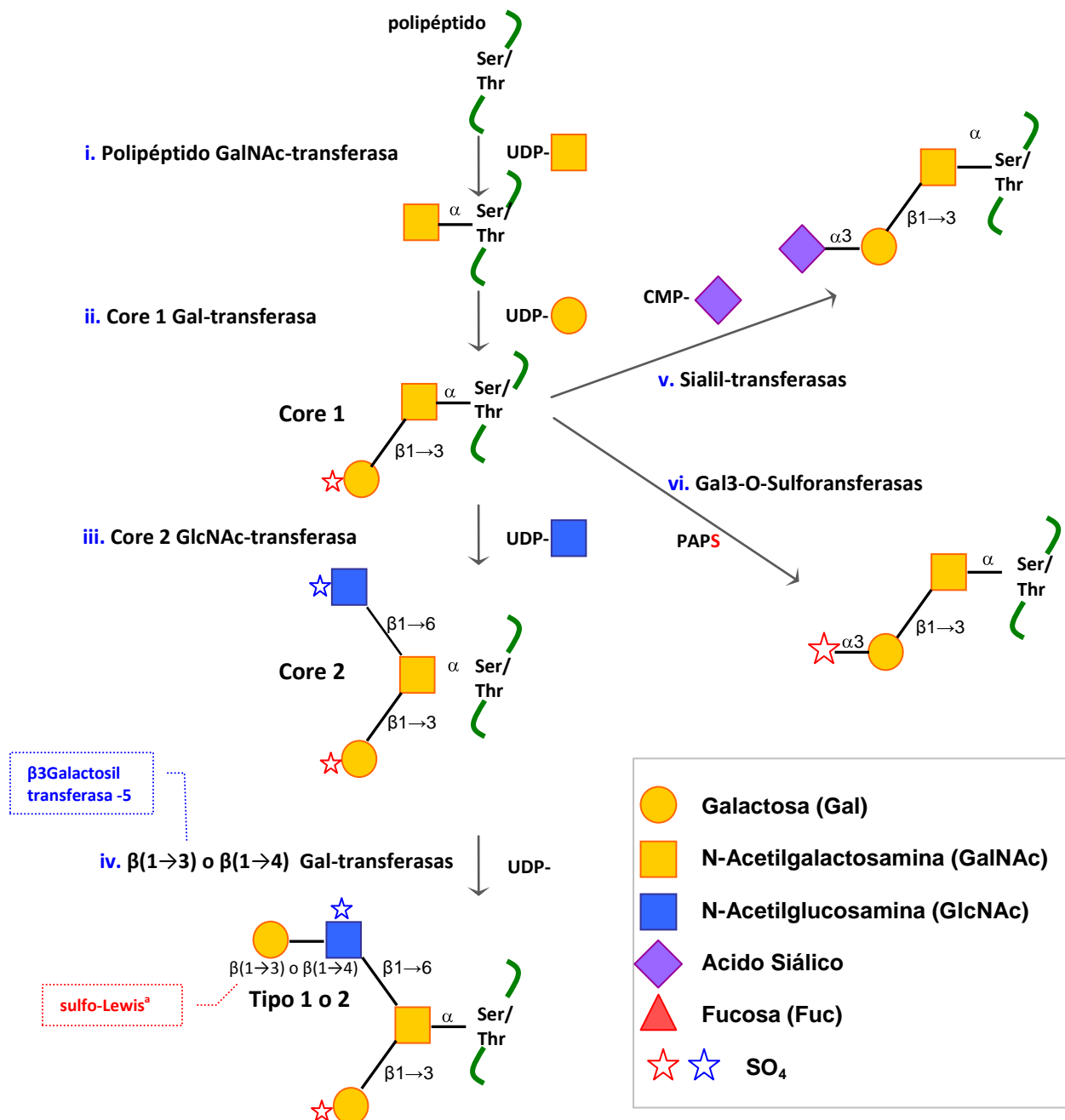


Figura 10. Síntesis, extensión y modificación secuencial de oligosacáridos complejos asociados al core proteico de las mucinas. La O-glicosilación comienza con la adición de un azúcar GalNAc a un residuo de serina (Ser) o treonina (Thr). La extensión de las cadenas de oligosacáridos continúa con la adición de una Galactosa en posición $\beta(1\rightarrow3)$ lo que da como producto una estructura core 1 [Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-Ser/Treo]. La estructura core 1 puede extenderse con una ramificación en que una GlcNAc es adicionada en posición $\beta(1\rightarrow6)$ a la GalNAc, formando una estructura core 2 [Gal $\beta(1\rightarrow3)$ -[GlcNAc $\beta(1\rightarrow6)$]-GalNAc-Ser/Treo], y esta ramificación puede extenderse con cadenas de tipo 1 o de tipo 2, en que a la GlcNAc se le adiciona una Galactosa en posición $\beta(1\rightarrow3)$ o $\beta(1\rightarrow4)$, respectivamente. Cada uno de los pasos de síntesis y extensión de estas estructuras es catalizada por diferentes familias de glicosiltransferasas, tales como: i. peptidil GalNAc-transferasas, ii. core 1 galactosil-transferasas, iii. core 2 GlcNAc-transferasas, iv. $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$ galactosil-transferasas, entre otras. Tanto las estructuras core 1, core 2, como las extensiones de tipo 1 y de tipo 2 son susceptibles de ser sulfatadas en el carbono 3 de la galactosa (estrellas rojas), reacción catalizada por enzimas Gal3-O-STs (vi). Estas estructuras sirven también de sustrato para sialiltransferasas (v). La sulfatación puede ocurrir también en el carbono 6 de la GlcNAc (estrellas azules), esta reacción es catalizada por GlcNAc-6-STs (no se muestran en el esquema).

Objetivo 1. Determinación de los niveles de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasas 2, 3 ,4 y β 3GalT-5

1.1 Determinación de los niveles de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasa 2

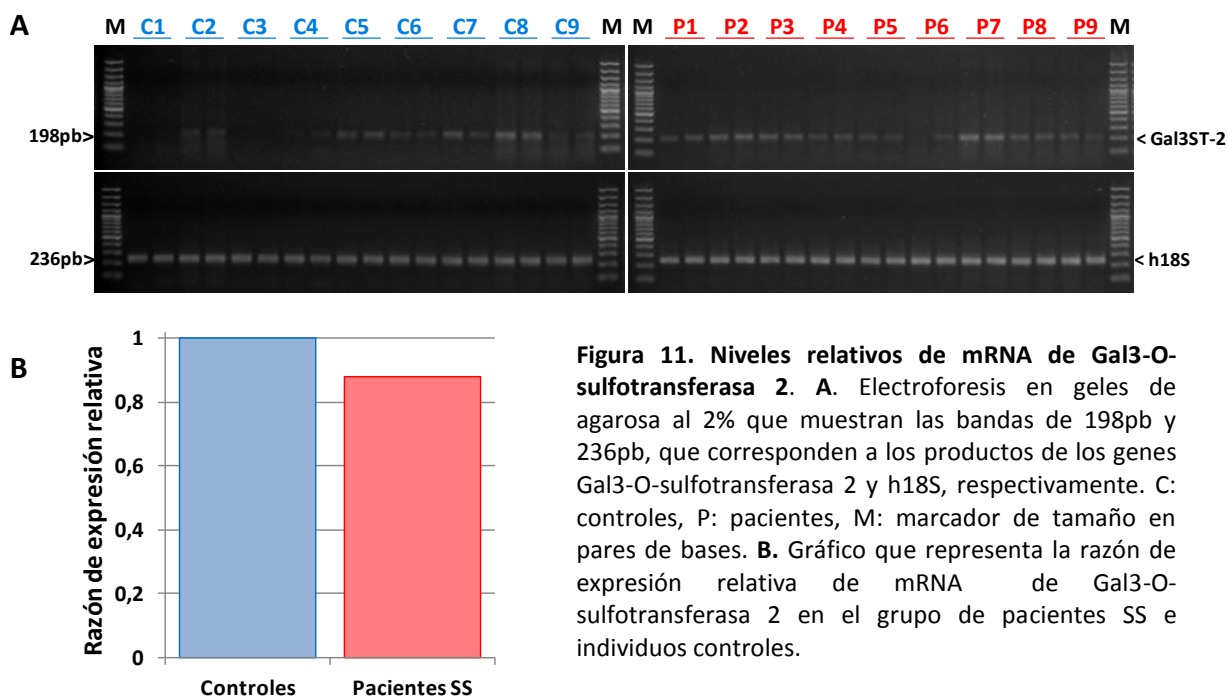
Se determinaron los niveles de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasa 2 en muestras de GSLs de 13 pacientes SS y 13 individuos controles. Para comprobar si el producto obtenido mediante PCR en tiempo real presentaba el tamaño esperado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% y se detectaron las bandas de 198pb y 236pb que correspondían a los productos de los genes Gal3-O-sulfotransferasa 2 y h18S, respectivamente (Figura 11A). Es necesario señalar que los productos obtenidos de la reacción de PCR en tiempo real son analizados en geles de agarosa sólo para comprobar la presencia de un producto único y de tamaño específico, la intensidad de las bandas no reflejan los niveles de expresión del gen de interés en cada muestra, ya que el análisis de tiempo real hace la evaluación en la fase exponencial de la reacción, mientras que el análisis de la intensidad de las bandas se realiza en la etapa final del proceso, donde los productos están en la fase de saturación de la reacción.

La cuantificación relativa del gen de interés con respecto al gen de referencia h18S se determinó aplicando la fórmula de Pfaffl [37]. En la Figura 11B, se grafican los resultados para el gen Gal3-O-sulfotransferasa 2, observándose una leve disminución en su expresión en el grupo de pacientes SS, con una razón de 0,88. El análisis estadístico indica que esta disminución es no significativa, con un $p=0,8$.

Las eficiencias de reacción y las razones de expresión obtenidas para cada gen de interés se señalan en la Tabla 7.

Tabla 7. Eficiencias, razones de expresión relativa y p obtenido para cada gen

Gen	Tipo	Eficiencia	Razón	p(H1)
h18S	Referencia	0,9	1	
Gal3ST-2	Interés	0,95	0,88	0,8
Gal3ST-3	Interés	0,98	0,89	0,88
Gal3ST-4	Interés	0,95	0,97	0,96
B3GalT-5	Interés	0,94	0,88	0,7



1.2. Determinación de los niveles de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasa 3

Antecedentes previos publicados por Seko y cols. [21] demuestran que las Gal3-O-sulfotransferasas 2 y 4 presentan una expresión de mRNA ubicua en los tejidos evaluados, mientras que el mRNA de Gal3-O-sulfotransferasa 3 sólo se encontró en tiroides, corazón, riñón y médula espinal. Considerando que Gal3-O-sulfotransferasa 3 también presenta afinidad por los oligosacáridos asociados a mucinas evaluamos la presencia de su mRNA en GSLs en 4 pacientes SS y 4 individuos controles, utilizando como control positivo una muestra de cDNA de tiroides humana. Para comprobar si el producto obtenido mediante PCR en tiempo real presentaba el tamaño esperado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, detectándose las bandas de 178pb y 236pb que correspondían a los productos de los genes Gal3-O-sulfotransferasa 3 y h18S, respectivamente en el control positivo. El producto de Gal3-O-sulfotransferasa 3 obtenido en las GSLs se encontraba en el límite de sensibilidad del método de PCR en tiempo real y las bandas esperadas eran casi indetectables, tanto en pacientes, como en controles (Figura 12A). La cuantificación relativa del gen de interés con respecto al gen de referencia h18S se determinó aplicando la fórmula de Pfaffl [37], en la Figura 12B se grafican los resultados para el gen Gal3-O-sulfotransferasa 3, observándose una leve disminución en su

expresión en el grupo de pacientes SS, con una razón de 0,89. El análisis estadístico indica que esta disminución es no significativa, con un $p=0,88$.

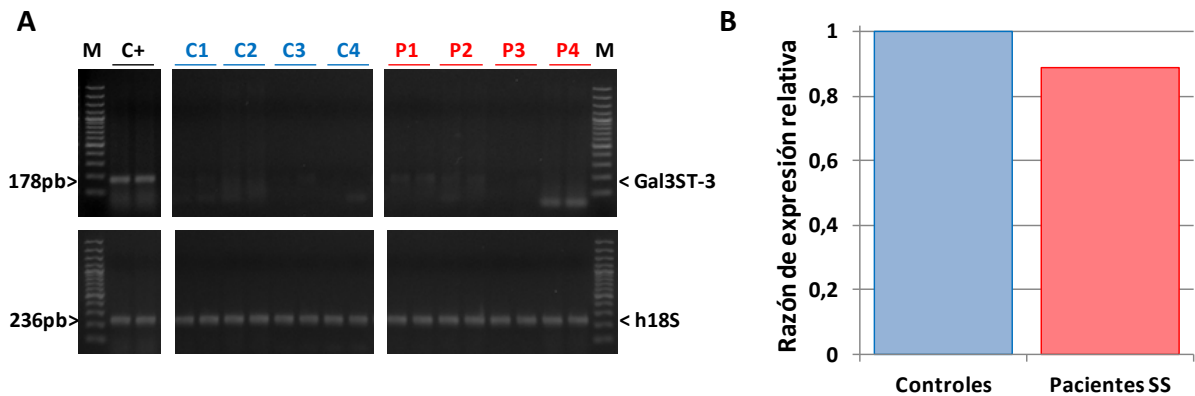
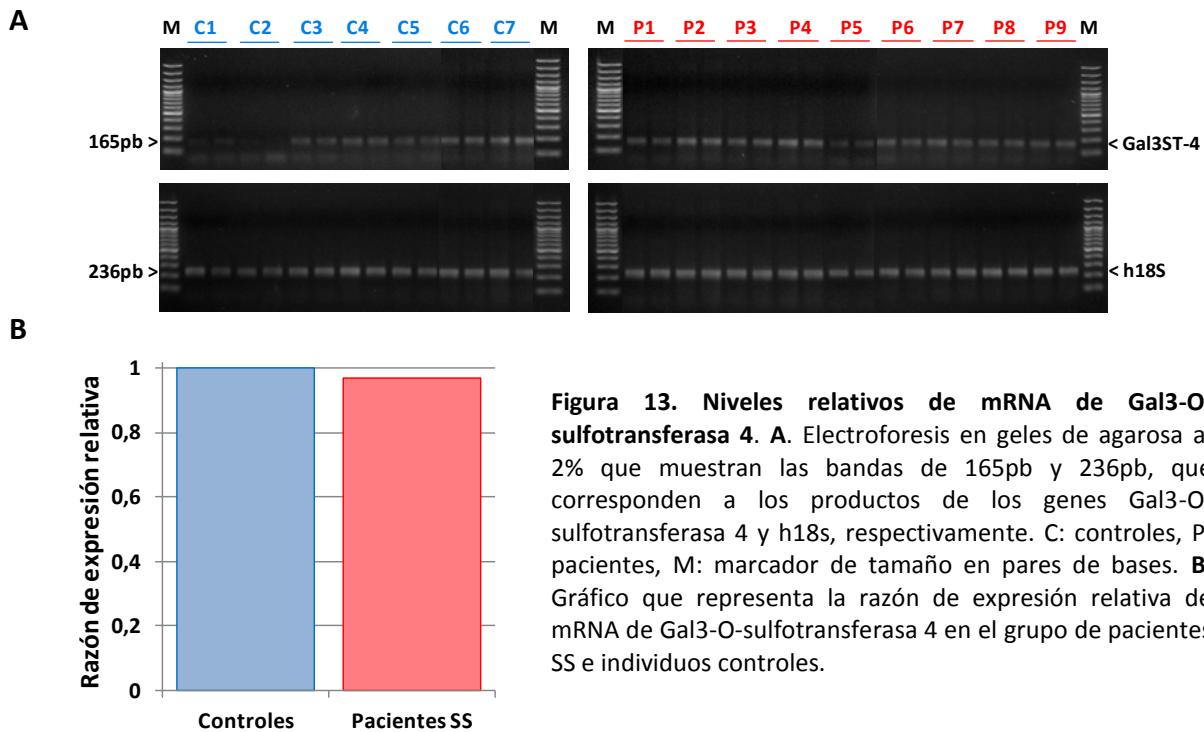


Figura 12. Niveles relativos de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasa 3. **A.** Electroforesis en gels de agarosa al 2% que muestran las bandas de 178pb y 236pb, que corresponden a los productos de los genes Gal3-O-sulfotransferasa 3 y h18S, respectivamente. C+: control positivo, C: controles, P: pacientes, M: marcador de tamaño en pares de bases. **B.** Gráfico que representa la razón de expresión relativa de mRNA de Gal3ST-3 en el grupo de pacientes SS e individuos controles.

1.3. Determinación de los niveles de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasa 4

Se determinaron los niveles de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasa 4 en muestras de GS de 13 pacientes SS y 13 individuos controles. Para comprobar si el producto obtenido mediante PCR en tiempo real presentaba el tamaño esperado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, detectándose las bandas de 165pb y 236pb que correspondían a los productos de los genes Gal3-O-sulfotransferasa 4 y h18S, respectivamente (Figura 13A). En la Figura 13B se grafican los resultados para el gen Gal3-O-sulfotransferasa 4, observándose una leve disminución en su expresión en el grupo de pacientes SS, con una razón de 0,97. El análisis estadístico indica que esta disminución es no significativa, con un $p=0,9$.

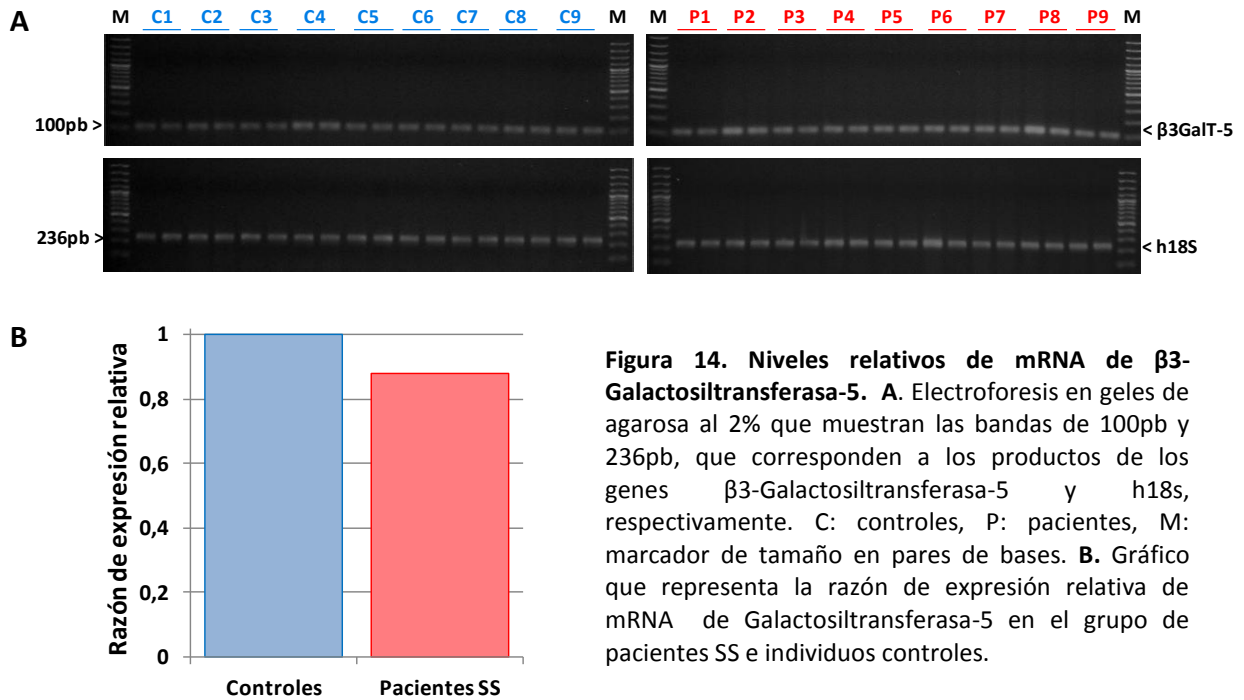


1.4. Determinación de los niveles de mRNA de β 3-Galactosiltransferasa 5

La enzima β 3-Galactosiltransferasa 5 (β 3GalT-5) está involucrada en la síntesis de oligosacáridos de estructura de tipo 1, a este tipo de estructura corresponde al antígeno sulfo-Lewis^a que se encuentra hiposulfatado en GSL de pacientes con SS. La enzima β 3-Galactosiltransferasa 5 adiciona la Galactosa en posición $\beta(1\rightarrow3)$ formando el sustrato Lewis^a. (ver Figura 10).

En esta tesis se determinaron los niveles de mRNA de β 3-Galactosiltransferasa 5 para verificar si la enzima responsable de la síntesis del sustrato Lewis^a se expresa en GSLs de pacientes SS (n=9) e individuos controles (n=9).

Para comprobar si el producto obtenido mediante PCR en tiempo real presentaba el tamaño esperado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, detectándose las bandas de 100pb y 236pb que correspondían a los productos de los genes β 3-Galactosiltransferasa 5 y h18S, respectivamente (Figura 14A). En la Figura 14B, se grafican los resultados para el gen galactosiltransferasa 5, observándose una leve disminución en su expresión en el grupo de pacientes SS, con una razón de 0,88. El análisis estadístico demuestra que esta disminución es no significativa, con un p= 0,7.



Objetivo 2. Determinación de los niveles relativos de proteínas de Gal3ST-2, 4 y β3-GalT-5

2.1 Determinación de los niveles relativos de proteína Gal3-O-sulfotransferasa 2

Se determinaron los niveles relativos de proteína Gal3ST-2 con respecto a β-actina en muestras de GSLs de 18 controles y 14 pacientes SS. La detección de Gal3ST-2 se realizó bajo condiciones denaturantes y reductoras. En estas condiciones se detectó una banda de 54kDa (Figura 15A). Los niveles relativos de Gal3ST-2 en el grupo control, se encontraron en el rango de 0,7 - 1,68 con un promedio de $1,14 \pm 0,28$, mientras que en el grupo de pacientes SS el rango fue de 0,5 - 1,5 con un promedio de $1,09 \pm 0,3$ (Figura 15B). Al realizar la comparación de los niveles relativos de esta proteína entre el grupo control y el grupo de pacientes SS encontramos que no hay diferencias ($p=0,92$).

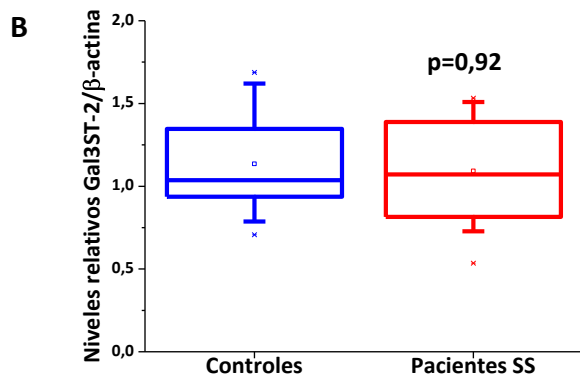
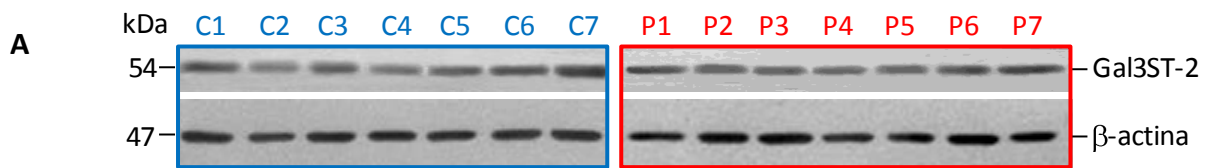


Figura 15. Niveles relativos de proteína de Gal3ST-2. A. Electroforesis en gels de acrilamida al 8% que muestra las bandas de 54kDa y 47kDa, que corresponden a las proteínas Gal3ST-2 y β -actina, respectivamente. C: controles, P: pacientes, B. Análisis densitométrico de las bandas Gal3ST-2/ β -actina. El análisis estadístico muestra que no hay diferencias entre los grupos, de acuerdo al test no paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,92$)

2.2 Determinación de los niveles relativos de proteína Gal3-O-sulfotransferasa 4

Se determinaron los niveles relativos de proteína Gal3ST-4 con respecto a β -actina en muestras de GSL de 21 pacientes SS y 19 individuos controles. La detección de Gal3ST-4 se realizó bajo condiciones denaturantes y reductoras. En estas condiciones se detectó una banda de 54kDa (Figura 16A). Los niveles relativos de Gal3ST-4 en el grupo control, se encontraron en el rango de 0,52 - 4,75 con un promedio de $1,68 \pm 1,1$, mientras que en el grupo de pacientes SS el rango fue de 0,17 - 4,26 con un promedio de $2,1 \pm 1,1$ (Figura 16B). Al realizar la comparación de los niveles relativos de esta proteína entre el grupo control y el grupo de pacientes SS encontramos una tendencia a aumentar en el grupo de pacientes SS, pero este aumento no es significativo ($p=0,085$).

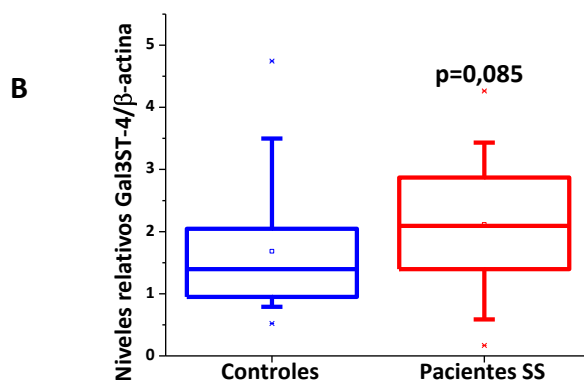
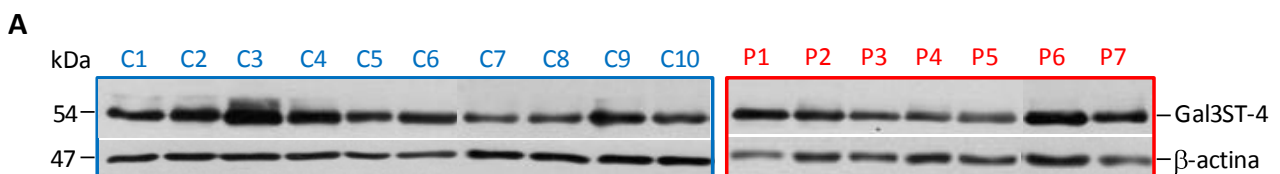


Figura 16. Niveles relativos de proteína de Gal3ST-4. A. Electroforesis en gels de acrilamida al 8% que muestra las bandas de 54kDa y 47kDa, que corresponden a las proteínas Gal3ST-4 y β -actina, respectivamente. C: controles, P: pacientes, B. Análisis densitométrico de las bandas Gal3ST-4/ β -actina. El análisis estadístico muestra una tendencia al aumento de Gal3ST-4 en los pacientes SS con respecto al grupo control. Esta diferencia es no significativa, de acuerdo al test no paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,085$)

2.3 Determinación de los niveles relativos de proteína β 3Galactosiltransferasa-5

Como se mencionó, la enzima β 3-Galactosiltransferasa 5 (β 3GalT-5) está involucrada en la síntesis de oligosacáridos de estructura de tipo 1, a este tipo de estructura corresponde al antígeno sulfo-Lewis^a que se encuentra hiposulfatado en GSL de pacientes con SS (ver Figura 10). Se realizó la determinación de los niveles relativos de proteína β 3GalT-5 con respecto a β -actina en muestras de GSL de 6 pacientes SS y 6 individuos controles. La detección de β 3GalT-5 se realizó bajo condiciones denaturantes y reductoras. En estas condiciones se detectó una banda de 50 kDa (Figura 17A). Los niveles relativos de β 3GalT-5 en el grupo control, se encontraron en el rango de 0,9 - 2,03 con un promedio de $1,54 \pm 0,49$, mientras que en el grupo de pacientes SS el rango fue de 0,5 - 2,59 con un promedio de $1,85 \pm 0,87$ (Figura 17B). Al realizar la comparación de los niveles relativos de esta proteína entre el grupo control y el grupo de pacientes SS encontramos una tendencia a aumentar en el grupo de pacientes SS, pero este aumento no es significativo ($p=0,39$).

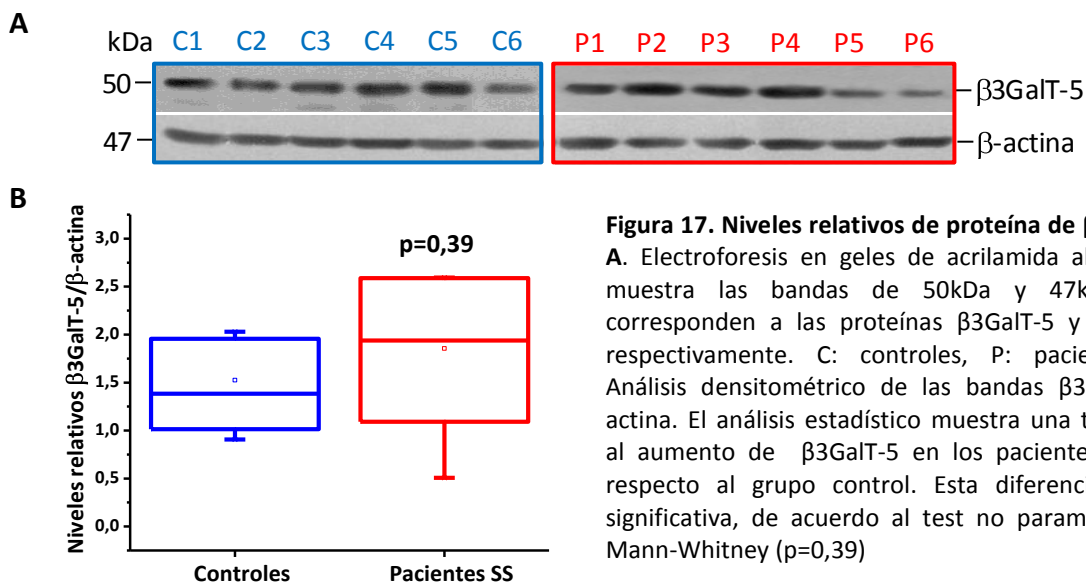


Figura 17. Niveles relativos de proteína de β 3GalT-5. A. Electroforesis en geles de acrilamida al 8% que muestra las bandas de 50kDa y 47kDa, que corresponden a las proteínas β 3GalT-5 y β -actina, respectivamente. C: controles, P: pacientes, B. Análisis densitométrico de las bandas β 3GalT-5/ β -actina. El análisis estadístico muestra una tendencia al aumento de β 3GalT-5 en los pacientes SS con respecto al grupo control. Esta diferencia es no significativa, de acuerdo al test no paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,39$)

Objetivo 3. Cuantificar la actividad enzimática de Gal3-O-sulfotransferasas y sialiltransferasas en extractos de GSL de pacientes con SS primario e individuos controles.

3.1. Cuantificación de los niveles de actividad enzimática de Gal3-O-sulfotransferasas en GSL

Para poder evaluar la actividad catalítica de Gal3-O-sulfotransferasas se desarrolló un nuevo ensayo enzimático *in vitro*, y se compararon los niveles de actividad encontrados en GSL entre el grupo de individuos controles ($n=10$) y el grupo de pacientes SS ($n=7$). Lo nuevo de este

ensayo se fundamenta en la cuantificación específica del producto de reacción después de una doble separación cromatográfica, que se explica *in extenso* en la sección de Materiales y Métodos. Este objetivo se desarrolló en el laboratorio de Glicobiología que dirige la Dra. Inka Brockhausen en Queen's University, Kingston, Ontario, Canadá.

Al comparar los niveles de actividad Gal3ST entre el grupo control y el grupo de pacientes SS encontramos una disminución significativa de los niveles de actividad de estas enzimas en GSLs de pacientes SS ($1,25 \pm 0,8$ pmoles/h x mg de proteína) con respecto a los individuos controles ($6,5 \pm 4$ pmoles/h x mg proteína) ($p=0,0004$) (Figura 18A).

Al hacer un análisis de correlación de los niveles de actividad Gal3ST con respecto a los niveles relativos de proteínas Gal3ST-2 y Gal3ST-4, encontramos que no hay correlación, de acuerdo al test de Spearman ($r=0,19$ y $-0,24$, respectivamente) (Figura 18B y C).

A

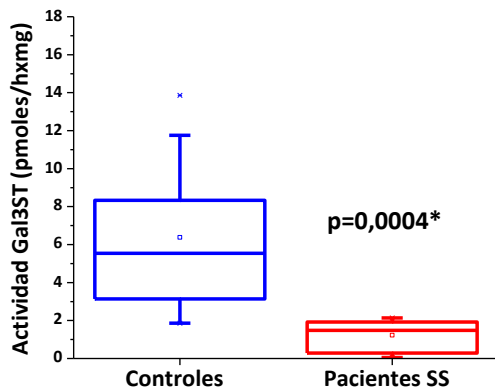
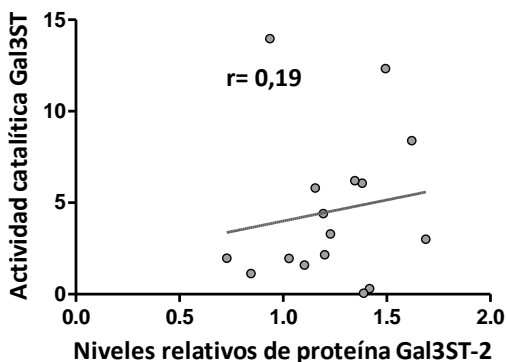


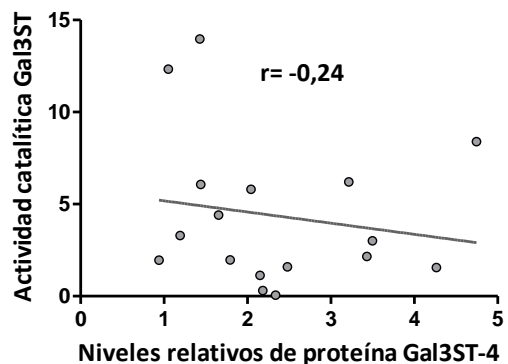
Figura 18. Niveles de actividad Gal3-O-sulfotransferasa.

A. Comparación de los niveles de actividad Gal3ST en GSLs de individuos controles ($n=10$) y de pacientes SS ($n=7$). Existe una disminución significativa de la actividad enzimática en pacientes SS con respecto a los controles ($p=0,0004$) de acuerdo al test no paramétrico de Mann-Whitney. **B y C.** Análisis de correlación entre los niveles de actividad catalítica de Gal3ST con respecto a los niveles relativos de proteínas Gal3ST-2/ β -actina ($r=0,19$) y Gal3ST-4/ β -actina ($r=-0,24$). Estos datos no tienen correlación de acuerdo al test de Spearman.

B



C



3.2. Cuantificación de la actividad enzimática de sialiltransferasas en GSL humanas

Tanto la sulfatación como la sialilación de los oligosacáridos del núcleo proteico de las mucinas, contribuyen a aumentar las cargas negativas y a favorecer la retención de moléculas de agua. En la extensión del oligosacárido en el complejo de Golgi, sialil y sulfo transferasas compiten por los mismos sustratos para adicionar el residuo final (ver Figura 10). En esta tesis comparamos la actividad enzimática de sialiltransferasas que presentan afinidad por el mismo sustrato aceptor analizado en el ensayo de actividad sulfotransferasa, Gal (β 1 \rightarrow 3) (6-deoxi)-GalNAc-Benzol.

Al comparar los valores de actividad sialiltransferasa, entre el grupo control y el grupo de pacientes SS, encontramos una tendencia a la disminución de la actividad de esta enzima en GSL de pacientes SS ($4,45 \pm 3$ nmoles/h x mg de proteína) con respecto a los individuos controles ($7,42 \pm 3$ nmoles/h x mg proteína), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0,08$) (figura 19).

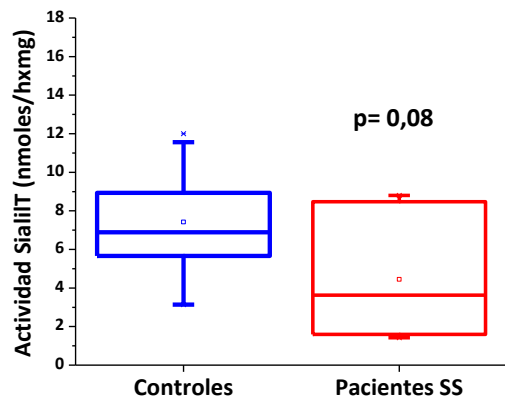


Figura 19. Niveles de actividad sialiltransferasa. Comparación de los niveles de actividad sialiltransferasa entre el grupo de pacientes SS (n=7) y el grupo control (n=10). El grupo de pacientes SS presenta una tendencia a disminuir los niveles de actividad sialiltransferasa, pero las diferencias encontradas no son significativas, de acuerdo al test no paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,08$).

Objetivo 4. Cuantificar la actividad enzimática de glicosiltransferasas involucradas en la síntesis y extensión de oligosacáridos complejos susceptibles de ser sulfatados.

La síntesis y extensión de oligosacáridos complejos asociados al núcleo proteico de las mucinas comienza con la adición de GalNAc a un residuo de serina o treonina (ver Figura 10). La extensión de las cadenas de oligosacáridos continúa con la adición de una Galactosa, lo que da como producto una estructura core 1 [Gal β (1 \rightarrow 3)-GalNAc-Ser/Treo]. La estructura core 1 puede ramificarse a nivel de la GlcNAc por la adición en posición β (1 \rightarrow 6) de GalNAc, formando una estructura core 2 Gal β (1 \rightarrow 3)-[GlcNAc β (1 \rightarrow 6)]-GalNAc-Ser/Treo. Esta ramificación puede

extenderse con cadenas tipo 1 o tipo 2, donde una Galactosa se adiciona a GlcNAc en posición $\beta(1\rightarrow3)$ o $\beta(1\rightarrow4)$, respectivamente. Tanto las estructuras core 1, core 2, como las extensiones de tipo 1 y de tipo 2 son susceptibles de ser sulfatadas en el carbono 3 de la Galactosa, en consecuencia son sustratos de las enzimas Gal3-O-sulfotransferasas (vi) (ver Figura 10).

Para evaluar si la hiposulfatación de mucinas encontrada en pacientes SS se debe a una disminución de la actividad catalítica de las sulfotransferasas o a una disminución de la actividad de las glicosiltransferasas involucradas en las etapas de formación de los oligosacáridos precursores que sirven de sustrato para las sulfotransferasas, se determinó la actividad catalítica de las enzimas *polipéptido GalNAc-transferasa (i)*, *core 1 Gal-transferasa (ii)*, *core 2 GlcNAc-transferasa (iii)* y $\beta(1\rightarrow3)$ o $\beta(1\rightarrow4)$ *Gal-transferasas (iv)* (ver Figura 10) en muestras de GSL de pacientes SS e individuos controles. Nuestros resultados demuestran, por primera vez en GSL humanas, que todas las glicosiltransferasas determinadas se encuentran activas (Figura 20).

La actividad de la enzima polipéptido GalNAc-transferasa se midió en GSLs de 7 controles y 6 pacientes SS. La actividad de esta enzima en el grupo control, se encontró en el rango de 2,8 – 14,2 con un promedio de $8,47 \pm 5,21$, mientras que en el grupo de pacientes SS el rango fue de 1,6 – 14,3 con un promedio de $7,5 \pm 5,81$. Al comparar los niveles de actividad de estas enzimas entre ambos grupos encontramos una leve disminución en pacientes SS, el análisis estadístico señala que la diferencia no es significativa ($p=0,53$) (Figura 20A).

La evaluación de los niveles de actividad enzimática de core 1 Gal-transferasa fue llevada a cabo en GSLs de 7 controles y 4 pacientes SS. La actividad de esta enzima en el grupo control, se encontró en el rango de 3,4 – 8,7 con un promedio de $6,64 \pm 1,92$, mientras que en el grupo de pacientes SS el rango fue de 2,1 – 7,1 con un promedio de $4,1 \pm 2,41$. Al comparar los niveles de actividad de estas enzimas entre ambos grupos nuevamente encontramos una leve disminución en pacientes SS, el análisis estadístico señala que esta diferencia no es significativa ($p=0,1$) (Figura 20B).

La actividad enzimática de core 2 GlcNAc-transferasa se midió en GSLs de 7 controles y 4 pacientes SS. La actividad de esta enzima presentó una gran variabilidad dentro de los individuos de cada grupo. En el grupo control, la actividad se encontró en el rango de 0,9 – 25 con un promedio de $10,61 \pm 7,88$, mientras que en el grupo de pacientes SS el rango fue de 4,4 –

15,49 con un promedio de $8,17 \pm 5,06$. El análisis estadístico muestra que la diferencia entre ambos grupos no es significativa ($p=0,52$) (Figura 20C).

La mayor variabilidad entre los individuos de cada grupo se encontró al evaluar los niveles de actividad de las enzimas $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$ Gal-transferasas. Esta determinación se realizó utilizando GSLs de 4 controles y 5 pacientes SS. La actividad de estas enzimas en el grupo control, se encontró en el rango de 18,3–57 con un promedio de $32,5 \pm 18,36$, mientras que en el grupo de pacientes SS el rango fue de 9,5 – 41,8 con un promedio de $25,06 \pm 15,2$. El análisis estadístico muestra que la diferencia entre ambos grupos no es significativa ($p=0,73$) (Figura 20D).

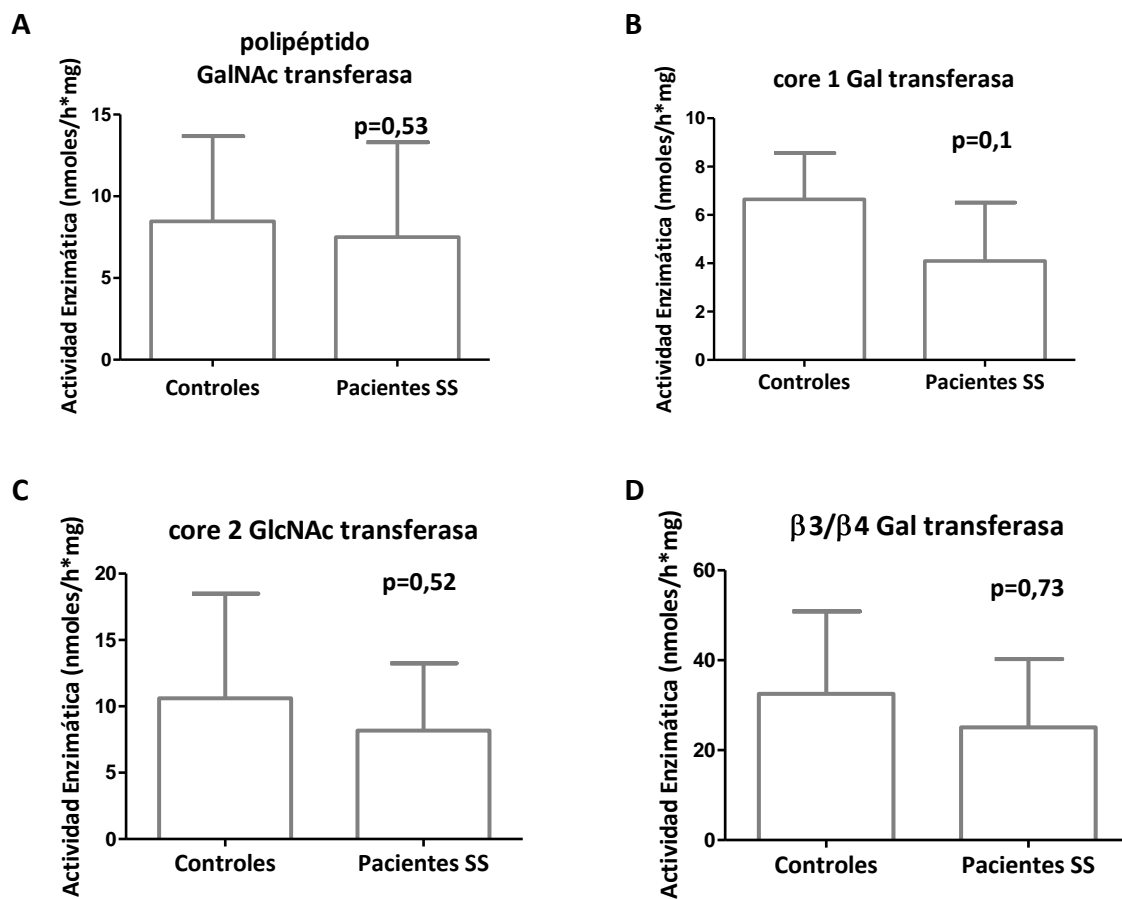


Figura 20. Comparación de los niveles de actividad de las glicosiltransferasas evaluadas en GSLs de controles y pacientes SS. A. Actividad peptidil GalNAc transferasa ($p=0,53$). B. Actividad core 1 Gal transferasa ($p=0,1$). C. Actividad core 2 GlcNAc transferasa ($p=0,52$). D. Actividad $\beta3/\beta4$ Gal transferasa ($p=0,73$).

Los oligosacáridos asociados al núcleo proteico de las mucinas presentan residuos sialilados y ésteres sulfatos que las convierten en polímeros polianiónicos hidrofílicos, capaces de capturar grandes cantidades de agua. Esta propiedad de las mucinas es la que permite la humectación de la superficie de las mucosas. Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que las GSLs de pacientes con SS presentan una disminución de los oligosacáridos sulfatados totales y una reducción del epítoto sulfo-Lewis^a asociado a MUC5B. La disminución de la sulfatación es similar en pacientes SS que presentan un flujo salival alterado, como en aquellos que tienen un flujo normal, sin embargo todos ellos presentan síntomas de sequedad bucal [11]. Alteraciones en el procesamiento post-traducciona de MUC5B provocarían una pérdida de aidez de la mucina por el agua, contribuyendo a la sensación de boca seca que experimentan los pacientes.

La síntesis y extensión de oligosacáridos complejos asociados al núcleo proteico de las mucinas involucra la acción secuencial de glicosiltransferasas localizadas en distintos compartimientos del complejo de Golgi. Este procesamiento comienza con la adición de GalNAc a un residuo de serina o treonina, reacción catalizada por la enzima *polipéptido GalNAc-transferasa*. La extensión de las cadenas de oligosacáridos continúa con la adición de una Galactosa, reacción catalizada por la enzima *core 1 Gal-transferasa*, lo que da como producto una estructura core 1 [Gal β (1 \rightarrow 3)-GalNAc-Ser/Treo]. Esta estructura core 1 puede ramificarse a nivel de la GlcNAc por la adición en posición β (1 \rightarrow 6) de GalNAc, reacción que es catalizada por la enzima *core 2 GlcNAc-transferasa*, formando una estructura core 2 Gal β (1 \rightarrow 3)-[GlcNAc β (1 \rightarrow 6)]-GalNAc-Ser/Treo. Esta ramificación puede extenderse con cadenas tipo 1 o tipo 2, donde una Galactosa se adiciona a GlcNAc en posición β (1 \rightarrow 3) o β (1 \rightarrow 4). Estas transferencias son catalizadas por enzimas β (1 \rightarrow 3) o β (1 \rightarrow 4) *Gal-transferasas*, respectivamente (ver Figura 10). Tanto las estructuras core 1 y core 2, como las extensiones de tipo 1 y de tipo 2 son susceptibles de ser sulfatadas en el carbono 3 de la Galactosa, en consecuencia son sustratos de las enzimas Gal3-O-sulfottransferasas.

Los factores involucrados en la sulfatación de las mucinas salivales son diversos. En esta tesis estudiamos algunas glicosiltransferasas que participan en la síntesis y extensión de los

oligosacáridos que sirven de sustrato para sulfotransferasas y además evaluamos la actividad de Gal3-O-sulfotransferasas y sialiltransferasas en GSLs de pacientes SS.

Expresión relativa de sulfotransferasas y glicosiltransferasas que participan en la síntesis de oligosacáridos en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren.

Para evaluar los niveles de expresión de las enzimas que catalizan la sulfatación de los oligosacáridos de MUC5B, determinamos los niveles relativos de mRNA de Gal3-O-sulfotransferasas 2, 3, 4 y de β 3Galactosiltransferasa-5 en extractos de GSLs de pacientes SS e individuos controles.

El análisis de los resultados obtenidos por PCR en tiempo real demuestra que hay expresión de los mensajeros de Gal3ST-2, 4 y β 3GalT-5 en los extractos de GSLs de pacientes SS e individuos controles. Los niveles de mRNA de Gal3ST-3 son muy bajos en GSLs de individuos controles y de pacientes SS, comparados con los niveles encontrados en un extracto de tiroides humana, utilizado como control positivo. Estos resultados concuerdan con antecedentes de la literatura que señalan que las Gal3STs 2 y 4 presentan una expresión de mRNA ubicua en los tejidos evaluados, mientras que el mRNA de Gal3ST-3 sólo se ha reportado en tiroides, corazón, riñón y médula espinal [21]. Al comparar los niveles de mRNA de Gal3ST-2, 3, 4 y β 3GalT-5 entre pacientes SS y controles, encontramos que no hay diferencias significativas.

La hiposulfatación de mucinas ha sido descrita también en otras patologías como el adenocarcinoma de colon. Uno de los antígenos sulfatados que se encuentra disminuido en ésta patología es el 91,9H ($\text{SO}_3^- \rightarrow \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow$)[40], en cuya síntesis participa la enzima β 3GalT-5. Salvini y cols. demuestran que el mRNA de esta enzima se expresa en mucosa normal de colon, pero no se expresa o se expresa en muy bajos niveles en adenocarcinomas [41]. Además, los niveles de mRNA de Gal3ST-2 son significativamente más bajos en adenocarcinomas no mucinosos, con respecto los niveles encontrados en la mucosa normal adyacente [21]. Estos resultados sugieren que la reducción del epítipo 91,9H en adenocarcinomas no mucinosos de colon es causada por la disminución de los niveles de expresión no solo de Gal3ST-2, sino también de β 3GalT-5, la cual sintetiza el oligosacárido sustrato de Gal3ST-2 [21]. La enzima β 3GalT-5 participa también en la síntesis del antígeno Lewis^a (Gal β (1 \rightarrow 3)-GlcNAc-), que se encuentra hiposulfatado en GSLs de pacientes SS. Por esta

razón evaluamos sus niveles de expresión en extractos de GSLs. Los resultados muestran que no hay diferencias en los niveles relativos de mRNA y proteínas de este enzima entre los grupos ($p=0,7$ y $0,39$, respectivamente). Estudios preliminares de nuestro laboratorio utilizando el anticuerpo E-9 anti sialil-Lewis^a en Western blot de homogeneizados de GSLs, determinaron que no existen diferencias significativas entre los niveles del residuo sialil-Lewis^a de MUC5B entre individuos controles y pacientes SS (datos no publicados). Esto sugiere que las enzimas que participan en la síntesis del antígeno Lewis^a, sustrato tanto para sialil como para sulfotransferasas, no presentaría alteraciones en sus niveles de expresión y de actividad enzimática en GSLs de pacientes SS, lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta tesis.

Actividad enzimática de sulfotransferasas y sialiltransferasas en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren.

Para evaluar si las GSLs de pacientes SS presentan cambios en los niveles de actividad enzimática de sulfotransferasas involucradas en la sulfatación de mucinas salivales, utilizamos una estrategia que permite hacer una cuantificación del producto formado puro, después de una doble separación cromatográfica mediante columnas de fase reversa y cromatografía líquida de alta resolución.

El sustrato aceptor utilizado en la reacción enzimática fue Gal β 1 \rightarrow 3(6-deoxi)GalNAc α -benzol, cuya estructura core 1 sirve de sustrato para Gal3STs-2 y -4. En fracciones enriquecidas en membrana de células COS-7 transfectadas con Gal3ST-2 o Gal3ST-4 se determinó la afinidad de cada enzima por diferentes sustratos y se encontró que Gal3ST-2 tiene alta afinidad por estructuras tipo 1, tipo 2 y core 1, mientras que Gal3ST-4 presenta afinidad casi exclusivamente por oligosacáridos core 1 [21, 42]. La actividad sulfotransferasa en GSL de pacientes SS es significativamente menor que la que presentan los individuos controles ($p=0,0004$). Para evaluar si esta disminución en la actividad de Gal3STs es consecuencia de alteraciones funcionales del proceso de sulfatación o de posibles variaciones en los niveles proteicos de estas enzimas, determinamos los niveles relativos de proteínas de Gal3ST-2 y Gal3ST-4. Nuestros resultados demuestran que no hay diferencias en los niveles relativos de estas proteínas entre pacientes y controles. No se encontró una correlación entre los niveles de actividad sulfotransferasa y los niveles proteicos de Gal3ST-2 y 4, demostrando que la disminución de la actividad enzimática no

es consecuencia de una menor cantidad de enzima presente. La disminución de la actividad sulfotransferasa explicaría la hiposulfatación de mucinas observada en GSLs de pacientes SS.

En esta tesis se compararon también los niveles de actividad enzimática de sialiltransferasas, que como mencionamos presentan afinidad por el mismo sustrato aceptor utilizado en el ensayo de actividad sulfotransferasa. Los resultados demuestran que los niveles de actividad sialiltransferasa disminuyen en aproximadamente un 40% en GSLs de pacientes SS, pero esta disminución no es significativa ($p=0,08$). Para corroborar la consistencia de este dato debería aumentarse el número de individuos. No obstante, los datos hasta ahora obtenidos demostrarían que en GSLs de pacientes SS la hiposulfatación de mucinas sería consecuencia de la disminución de la actividad de las sulfotransferasas y no de alteraciones generalizadas en los procesos de modificación post-traduccionales de proteínas de secreción.

Actividad enzimática de glicosiltransferasas que participan en la síntesis de sustratos de sulfotransferasas en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren.

Para verificar que la hiposulfatación de mucinas encontrada en pacientes SS se debe a una disminución de la actividad catalítica de las sulfotransferasas, y no a alteraciones en la síntesis de los oligosacáridos precursores de sulfatación y/o sialilación, determinamos la actividad catalítica de las enzimas involucradas en esta vía. En esta tesis se determinó por primera vez en glándulas salivales humanas y más aún en pacientes SS la actividad peptidil GalNAc-transferasa, core 1 Galactosil-transferasa, core 2 GlcNAc-transferasa, $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$ Galactosil-transferasas. Nuestros resultados demuestran que todas las enzimas evaluadas están activas en GSLs humanas, demostrando que la vía conducente a la formación del sustrato a sulfatar está funcional.

En este mismo contexto, al analizar los resultados de la actividad enzimática para el grupo control y el grupo de pacientes SS encontramos que la enzima responsable de la adición del primer residuo de azúcar a los aminoácidos serina o treonina, peptidil GalNAc-transferasa, no presenta cambios en sus niveles de actividad entre ambos grupos ($p=0,53$). De manera similar, al comparar los niveles de actividad de las enzimas responsables de la extensión de los oligosacáridos asociados a las mucinas, core 1 Galactosil-transferasa, core 2 GlcNAc-transferasa y $\beta(1\rightarrow3)/\beta(1\rightarrow4)$ Galactosil-transferasas, encontramos que no presentan cambios significativos

entre el grupo control y el grupo de pacientes SS, con valores de $p=0,1$, $p=0,52$ y $p=0,73$, respectivamente. Estos resultados demuestran que la vía de síntesis de los oligosacáridos que sirven de sustrato para Gal3-O-sulfotransferasas se encuentra activa en GSL de pacientes SS. Entonces, la hiposulfatación de MUC5B y la reducción de los oligosacáridos sulfatados totales en GSLs de pacientes SS sería consecuencia de alteraciones funcionales del proceso de sulfatación.

Sulfatación de oligosacáridos asociados a mucinas.

Para que ocurra la sulfatación de oligosacáridos asociados a mucinas se requiere, además de los sustratos aceptores, de PAPS, el co-sustrato dador de las reacciones de sulfotransferencia. Un factor relevante en la síntesis de PAPS es la disponibilidad de sulfato inorgánico. La homeostasis del sulfato se mantiene principalmente por absorción intestinal y reabsorción renal [26]. En mujeres post-menopáusicas se ha descrito una disminución de los niveles séricos de sulfato y una reducción en la reabsorción renal [43]. La disminución de sulfato disponible eventualmente podría contribuir a la hiposulfatación de mucinas en GSLs de pacientes SS, dado que este síndrome se manifiesta preferentemente durante el climaterio. No obstante, en este estudio este factor no explica la disminución de la actividad sulfotransferasa, ya que los experimentos fueron realizados en presencia de concentraciones saturantes de PAP[³⁵S] (6,5 μ M).

Utilizando el sulfato inorgánico, el PAPS es sintetizado en el citosol por una sintetasa bifuncional con actividad ATP-sulfurilasa y APS-quinasa [26]. La disminución de la síntesis de PAPS por inhibición competitiva de la ATP-sulfurilasa utilizando clorato de sodio provoca una disminución de la sulfatación de proteínas [44]. Sin embargo, el aumento en la síntesis de PAPS por sobreexpresión de la PAPS sintetasa no se traduce en un aumento de la sulfatación [45], lo que permite postular que los transportadores de PAPS serían blancos relevantes en la regulación de la disponibilidad de PAPS en el complejo de Golgi. En GS humanas se han descrito dos transportadores de PAPS (PAPST-1 y PAPST-2) [28, 29]. La sobreexpresión de PAPST-1 en células MDCK II y posterior fraccionamiento subcelular mostró un aumento en los niveles de PAPS radiactivo en el interior de las vesículas de Golgi, comparado con vesículas aisladas de células MDCK II no transfectadas. En las mismas células transfectadas con PAPST-1 hay un aumento de tres veces en la sulfatación de glicosaminoglicanos de localización apical, y un leve

aumento en glicosaminoglicanos de localización basolateral, indicando que la disponibilidad de PAPS al interior del Golgi es determinante en los niveles de sulfatación de los oligosacáridos [46]. Por otra parte, células DLD-1, provenientes de cáncer colorectal y que expresan oligosacáridos sulfatados, fueron transfectadas con RNA interferentes para PAPST-1 o PAPST-2 y marcadas metabólicamente con $\text{Na}_2[^{35}\text{S}]\text{O}_4$ por 24 para evaluar la incorporación de radiactividad en las proteínas sintetizadas. El silenciamiento de PAPST-1 provocó una disminución de dos tercios de la sulfatación de proteínas, mientras que el silenciamiento de PAPST-2 redujo a la mitad la sulfatación de las proteínas, respecto a las células transfectadas con el RNA control [47]. Sería muy interesante determinar los niveles de expresión y actividad de estos transportadores en pacientes SS, con el propósito de evaluar si son responsables de la disminución de la actividad de sulfotransferasas en las GSLs de los pacientes SS.

Otro factor que se ha visto involucrado en la glicosilación y sulfatación de mucinas son las citoquinas pro-inflamatorias, las cuales se encuentran aumentadas en pacientes SS [48]. En líneas celulares de cáncer de colon, diferenciadas a células caliciformes, $\text{TNF-}\alpha$ induce alteraciones en la síntesis y procesamiento postraduccional de mucinas, provocando un aumento de la expresión de antígenos oncofetales, como el antígeno TF (Thomsen Friedenreich o core 1) y disminución de la sulfatación [49]. Estos cambios son similares a los encontrados *in vivo* en cáncer de colon y colitis ulcerosa [50]. Las glicoproteínas sulfatadas sintetizadas por los sinoviocitos son fundamentales para la mantención de la integridad de las articulaciones. El ambiente inflamatorio, como el que presentan los pacientes con artritis reumatoídea, tiene efectos en la proliferación de sinoviocitos y síntesis de glicoproteínas sulfatadas. Cultivos primarios de sinoviocitos bovinos expuestos a 40ng/mL de $\text{TNF-}\alpha$ durante 24 horas, presentan una reducción de un 50% de la actividad Gal3-O-sulfotransferasa, con respecto a la actividad que presentan las células no expuestas a esta citoquina [51]. Estos antecedentes permiten postular que en GSLs de pacientes SS, el aumento de $\text{TNF-}\alpha$ y otras citoquinas proinflamatorias podrían estar involucradas en la disminución de la actividad de las sulfotransferasas y la hiposulfatación de MUC5B. Sería relevante evaluar el efecto de $\text{TNF-}\alpha$ y otras citoquinas proinflamatorias en los niveles de actividad de glicosil y sulfotransferasas de GSLs de individuos controles y correlacionar estos resultados con los descritos en GSLs de pacientes SS.

Los resultados de esta tesis ayudan a comprender la causa de la hiposulfatación de MUC5B en GSLs de pacientes SS, no obstante es necesario explorar algunos de los escenarios planteados que permitan, con mayor certeza, determinar el o los factores que provocan la disminución de la actividad de las sulfotransferasas.

Alteraciones en la calidad de las mucinas salivales impiden la retención de moléculas de agua y la consecuente humectación de la mucosa oral. La implementación de futuras terapias que consideren estas alteraciones en los productos de secreción permitiría reducir la sensación de sequedad y mejorar la calidad de vida de los pacientes con síndrome de Sjögren.

1. Los resultados de esta tesis muestran por primera vez que las enzimas involucradas en la síntesis y extensión de oligosacáridos asociados a mucinas: peptidil GalNAc-transferasa, core 1 Galactosil-transferasa, core 2 GlcNAc-transferasa, $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$ Galactosil-transferasas, se encuentran activas en GSLs humanas. Los niveles de actividad de todas estas enzimas en GSL son similares en pacientes SS e individuos controles.
2. El antígeno Lewis^a, sustrato de sulfo y sialiltransferasas, es sintetizado por la enzima β 3Galactosiltransferasa-5. Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que no hay diferencias en los niveles de sialil-Lewis^a asociado a MUC5B en GSLs de pacientes SS, por lo que la disminución del residuo sulfo-Lewis^a en los pacientes no sería consecuencia de alteraciones en la síntesis del oligosacárido Lewis^a. Estos antecedentes concuerdan con resultados de esta tesis que demuestran que los niveles relativos de mRNA y proteína de β 3Galactosiltransferasa-5 no presentan cambios entre controles y pacientes SS y que los niveles de actividad sialiltransferasa son similares en las GSLs de ambos grupos.
3. En GSLs de pacientes SS hay una disminución significativa de los niveles de actividad de Gal3-O-sulfottransferasas, respecto a los controles. Nuestros resultados demuestran que no hay diferencias en los niveles relativos de estas proteínas y que no hay correlación entre los niveles de actividad sulfottransferasa y los niveles proteicos de Gal3ST-2 y 4, demostrando que la disminución de la actividad enzimática no es consecuencia de una menor cantidad de enzima presente.

La disminución de la actividad sulfottransferasa explicaría la hiposulfatación de mucinas observada en GSLs de pacientes SS. Para determinar el o los factores que provocan la disminución de la actividad de las sulfottransferasas en pacientes SS, consideramos necesario evaluar el efecto de citoquinas proinflamatorias, aumentadas en pacientes SS, sobre estas enzimas. Además se debe estudiar la participación de transportadores de PAPS en la incorporación del sustrato de estas enzimas al interior del complejo de Golgi.

1. Anaya, J., Ramos, M., García, M., *Síndrome de Sjögren*. Primera ed. 2001, Medellín: Corporación para investigaciones biológicas.
2. Ramos-Casals, M. and J. Font, *Primary Sjogren's syndrome: current and emergent aetiopathogenic concepts*. *Rheumatology (Oxford)*, 2005. **44**(11): p. 1354-67.
3. Fox, R.I. and M. Stern, *Sjogren's syndrome: mechanisms of pathogenesis involve interaction of immune and neurosecretory systems*. *Scand J Rheumatol Suppl*, 2002(116): p. 3-13.
4. Fox, R.I., *Sjogren's syndrome*. *Lancet*, 2005. **366**(9482): p. 321-31.
5. Robinson, C.P., et al., *A novel NOD-derived murine model of primary Sjogren's syndrome*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(1): p. 150-6.
6. Robinson, C.P., et al., *Elevated levels of cysteine protease activity in saliva and salivary glands of the nonobese diabetic (NOD) mouse model for Sjogren syndrome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(11): p. 5767-71.
7. Perez, P., et al., *Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(12): p. 2807-17.
8. Perez, P., et al., *Increased acinar damage of salivary glands of patients with Sjogren's syndrome is paralleled by simultaneous imbalance of matrix metalloproteinase 3/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and matrix metalloproteinase 9/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 ratios*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(9): p. 2751-60.
9. Goicovich, E., et al., *Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjogren's syndrome patients: correlation with reduced structural integrity of acini and ducts*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(9): p. 2573-84.
10. Molina, C., et al., *Basal lamina disorganisation of the acini and ducts of labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome: association with mononuclear cell infiltration*. *Ann Rheum Dis*, 2006. **65**(2): p. 178-83.
11. Allende, C., et al., *Reduced sulfation of muc5b is linked to xerostomia in patients with Sjogren syndrome*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(10): p. 1480-7.
12. Aps, J.K. and L.C. Martens, *Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva*. *Forensic Sci Int*, 2005. **150**(2-3): p. 119-31.
13. Veerman, E.C., et al., *Distinct localization of MUC5B glycoforms in the human salivary glands*. *Glycobiology*, 2003. **13**(5): p. 363-6.
14. Thornton, D.J., K. Rousseau, and M.A. McGuckin, *Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus*. *Annu Rev Physiol*, 2008. **70**: p. 459-86.
15. Hollingsworth, M.A. and B.J. Swanson, *Mucins in cancer: protection and control of the cell surface*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(1): p. 45-60.
16. Brockhausen, I., *Sulphotransferases acting on mucin-type oligosaccharides*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(2): p. 318-25.
17. Thomsson, K.A., et al., *The salivary mucin MG1 (MUC5B) carries a repertoire of unique oligosaccharides that is large and diverse*. *Glycobiology*, 2002. **12**(1): p. 1-14.
18. Prakobphol, A., et al., *Highly glycosylated human salivary molecules present oligosaccharides that mediate adhesion of leukocytes and Helicobacter pylori*. *Biochemistry*, 2005. **44**(6): p. 2216-24.
19. Veerman, E.C., et al., *A monoclonal antibody directed against high M(r) salivary mucins recognizes the SO3-3Gal beta 1-3GlcNAc moiety of sulfo-Lewis(a): a histochemical survey of human and rat tissue*. *Glycobiology*, 1997. **7**(1): p. 37-43.
20. Saari, H., et al., *Salivary mucous glycoprotein MG1 in Sjogren's syndrome*. *Clin Chim Acta*, 1997. **259**(1-2): p. 83-96.
21. Seko, A., et al., *Down-regulation of Gal 3-O-sulfotransferase-2 (Gal3ST-2) expression in human colonic non-mucinous adenocarcinoma*. *Jpn J Cancer Res*, 2002. **93**(5): p. 507-15.
22. Dawson, L.J., P.C. Fox, and P.M. Smith, *Sjogrens syndrome--the non-apoptotic model of glandular hypofunction*. *Rheumatology (Oxford)*, 2006. **45**(7): p. 792-8.
23. Brockhausen I., S.H., y Stanley P., *O-GalNAc Glycans*, in *Essentials of Glycobiology*, A.C. Varki, R.D.; Esko, J.D.; Freeze, H.H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G.W.; Etzler, M.E., Editor. 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press: La Jolla, California.

24. Chapman, E., et al., *Sulfotransferases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. **43**(27): p. 3526-48.
25. Bojarova, P. and S.J. Williams, *Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination*. *Curr Opin Chem Biol*, 2008. **12**(5): p. 573-81.
26. Klaassen, C.D. and J.W. Boles, *Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation*. *FASEB J*, 1997. **11**(6): p. 404-18.
27. Beck, L. and C. Silve, *Molecular aspects of renal tubular handling and regulation of inorganic sulfate*. *Kidney Int*, 2001. **59**(3): p. 835-45.
28. Kamiyama, S., et al., *Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(28): p. 25958-63.
29. Kamiyama, S., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter, PAPST2*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(16): p. 10945-53.
30. Caffaro, C.E. and C.B. Hirschberg, *Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus: from basic science to diseases*. *Acc Chem Res*, 2006. **39**(11): p. 805-12.
31. Negishi, M., et al., *Structure and function of sulfotransferases*. *Arch Biochem Biophys*, 2001. **390**(2): p. 149-57.
32. Rath, V.L., D. Verdugo, and S. Hemmerich, *Sulfotransferase structural biology and inhibitor discovery*. *Drug Discov Today*, 2004. **9**(23): p. 1003-11.
33. Honke, K. and N. Taniguchi, *Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides*. *Med Res Rev*, 2002. **22**(6): p. 637-54.
34. Vitali, C., et al., *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group*. *Ann Rheum Dis*, 2002. **61**(6): p. 554-8.
35. Daniels, T.E., *Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases*. *Arthritis Rheum*, 1984. **27**(2): p. 147-56.
36. Maniatis, T.F., E.F. Sambrook, J., *Molecular cloning a laboratory manual*. first ed. Vol. 1. 1982, United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory. 267.
37. Pfaffl, M.W., *Quantitative mRNA Analytics in Molecular Endocrinology*, D.o.A.S. Chair of Physiology, Center of life and food sciences, Editor. 2003: Weihenstephaner. p. 41.
38. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
39. Brockhausen, I., F. Vavasseur, and X. Yang, *Biosynthesis of mucin type O-glycans: lack of correlation between glycosyltransferase and sulfotransferase activities and CFTR expression*. *Glycoconj J*, 2001. **18**(9): p. 685-97.
40. Yamori, T., et al., *Differential production of high molecular weight sulfated glycoproteins in normal colonic mucosa, primary colon carcinoma, and metastases*. *Cancer Res*, 1987. **47**(10): p. 2741-7.
41. Salvini, R., et al., *beta 1,3-Galactosyltransferase beta 3Gal-T5 acts on the GlcNAc beta 1-->3Gal beta 1-->4GlcNAc beta 1-->R sugar chains of carcinoembryonic antigen and other N-linked glycoproteins and is down-regulated in colon adenocarcinomas*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(5): p. 3564-73.
42. Seko, A., S. Hara-Kuge, and K. Yamashita, *Molecular cloning and characterization of a novel human galactose 3-O-sulfotransferase that transfers sulfate to gal beta 1-->3galNAc residue in O-glycans*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 25697-704.
43. Benincosa, L.J., et al., *Effects of acute caffeine ingestion and menopause on sulfate homeostasis in women*. *Life Sci*, 1995. **57**(16): p. 1497-505.
44. Fjeldstad, K., et al., *Sulfation in the Golgi lumen of Madin-Darby canine kidney cells is inhibited by brefeldin A and depends on a factor present in the cytoplasm and on Golgi membranes*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(39): p. 36272-9.
45. Girard, J.P., E.S. Baekkevold, and F. Amalric, *Sulfation in high endothelial venules: cloning and expression of the human PAPS synthetase*. *FASEB J*, 1998. **12**(7): p. 603-12.
46. Dick, G., F. Grondahl, and K. Prydz, *Overexpression of the 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) transporter 1 increases sulfation of chondroitin sulfate in the apical pathway of MDCK II cells*. *Glycobiology*, 2008. **18**(1): p. 53-65.
47. Kamiyama, S., et al., *Expression and role of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters in human colorectal carcinoma*. *Glycobiology*.
48. Fox, R.I., et al., *Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome*. *J Immunol*, 1994. **152**(11): p. 5532-9.

49. Campbell, B.J., L.G. Yu, and J.M. Rhodes, *Altered glycosylation in inflammatory bowel disease: a possible role in cancer development*. *Glycoconj J*, 2001. **18**(11-12): p. 851-8.
50. Corfield, A.P., et al., *Colonic mucins in ulcerative colitis: evidence for loss of sulfation*. *Glycoconj J*, 1996. **13**(5): p. 809-22.
51. Yang, X., et al., *The effect of TNF-alpha on glycosylation pathways in bovine synoviocytes*. *Biochem Cell Biol*, 2004. **82**(5): p. 559-68.