



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
MECANISMO DE ACCIÓN Y SÍNTESIS DE
LAS HEPARINAS**

Autor: Pedro Manuel Angulo Oliva

Fecha: Junio 2019

Tutor: María José Hernáiz Gómez-Dégano

ÍNDICE

1. Resumen.....	2
1.1. Abstract.....	2
2. Introducción.....	3
2.1. Cascada de coagulación.....	5
2.2. Crisis de las heparinas 2008.....	6
3. Objetivos.....	7
4. Metodología.....	7
5. Resultados y discusión.....	7
5.1. Mecanismo de acción.....	7
5.1.1. Heparinas no fraccionadas (HNF).....	7
5.1.2. Heparinas fraccionadas o de bajo peso molecular (HBPM).....	9
5.1.3. Heparinas de ultrabajo peso molecular.....	9
5.1.4. Antídoto. Protamina.....	9
5.2. Síntesis de heparinas.....	10
5.2.1. Biosíntesis.....	10
5.2.2. Síntesis quimioenzimática.....	15
6. Conclusión.....	18
7. Bibliografía.....	19

1. RESUMEN Y ABSTRACT

“Hoy no se entendería buena parte de la mejora sanitaria sin este fármaco” dijo la OMS en 2016 en el centenario del descubrimiento de las heparinas. Desde su descubrimiento por McLean en 1916 hasta la actualidad, la heparina y sus derivados han supuesto una revolución en la clínica.

Se ha ido mejorando este fármaco, empezando desde las heparinas originales que son las de alto peso molecular, pasando por las heparinas de bajo peso molecular y hasta llegar a las últimas y más novedosas heparinas de ultrabajo peso molecular. Conforme avanzamos a las más novedosas, gracias a que se mejoraba su mecanismo de acción, se conseguía un efecto mayor y una disminución de efectos secundarios. Todas ellas van a intervenir en la cascada de coagulación, inhibiendo alguno de sus factores.

En 2008, una fallo en la obtención de las heparinas generó unas heparinas adulteradas sobresulfatadas, que por desgracia llegaron al mercado y provocaron decenas de muertes en EEUU. Desde ese momento, se ha intensificado la búsqueda de un método de síntesis alternativo al biosintético, como puede ser una síntesis quimioenzimática o síntesis química. Pero esto no está resultado fácil de conseguir debido a la gran heterogeneidad en la estructura de la heparina.

ABSTRACT

“Nowadays an important part of the health improvement could not be understood without this drug”, said the WHO in 2016, in the centenary of the heparins discovery celebration.

This drug has been continuously improved, starting with the original heparins, which are the ones with high molecular weight, passing through the low molecular weight ones, until reaching to the last and the most innovative ultralow molecular weight heparins. Throughout the development to the most ground-breaking heparins, and due to the enhancement of its drive mechanism, a greater effect and a reduction of its side effects was reached. All of them are going to interfere in the clotting cascade, inhibiting some of their factors.

In 2008, a failure in the heparins obtention caused oversulfated tainted heparins, which unfortunately reached the public and triggered dozens of deaths in the USA. Since then, the search for an alternative synthesis method than the biosynthetic, such as a chemosensitivity or chemistry synthesis has been intensified. However, this has not been easy, due to a great heterogeneity in the heparin structure.

2. INTRODUCCIÓN

La heparina (HP), como muchas sustancias químicas que hoy en día son muy importantes para el tratamiento de determinadas patologías, fue descubierta de forma casual en un laboratorio en la Facultad de medicina Johns Hopkins, ubicada en Baltimore, Estados Unidos. Este descubrimiento se puede atribuir al estudiante de segundo año de medicina Jay McLean, que en ese momento formaba parte del grupo de investigación del profesor William Howell.⁽¹⁾

McLean, al mando del Howell, tenía la misión de extraer sustancias tromboplásticas de diversos tejidos, es decir, encontrar alguna sustancia que promoviese la coagulación sanguínea. Lo que resulta curioso es que al final lo que encontrase, fuese un extracto totalmente opuesto a su búsqueda inicial ya que la heparina es un anticoagulante. Este descubrimiento tuvo lugar en 1916, aunque su uso como medicamento humano no sería hasta varios años después, en los años 30.⁽¹⁾

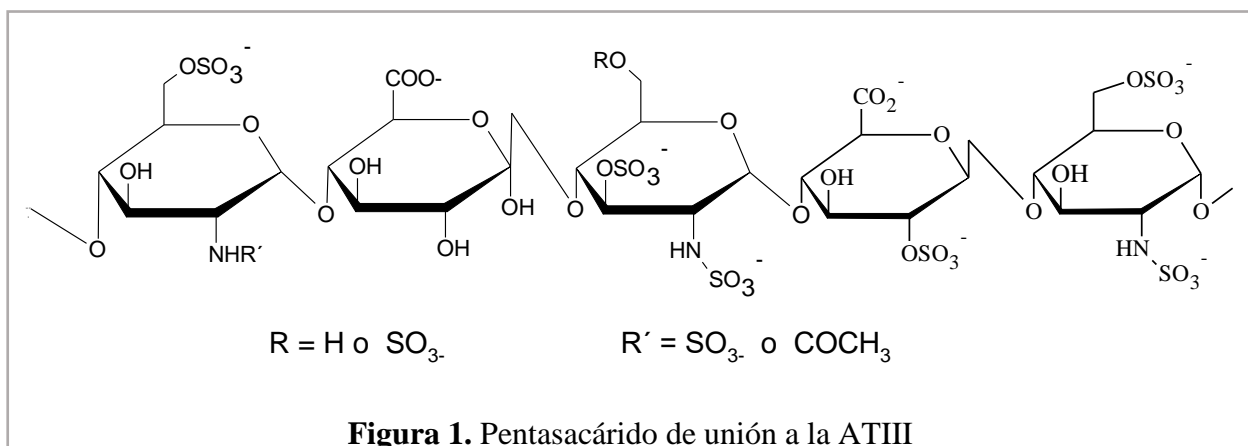
En la década de los 40, se consiguió desarrollar procesos de obtención de heparina purificada bastante económico. En este momento lo que se usaba como anticoagulante era la heparina no fraccionada (HNF); y no será hasta los años 80 cuando tiene lugar la revolución del fármaco, momento en el que se consiguió obtener moléculas de heparina de menor peso molecular, al simplificar la estructura de esta. Esta última se conoce como heparina fraccionada (HBPM) y supuso una revolución. Se observó que tenían mecanismos diferentes ya que estas solo actuaban en un punto de la cascada de coagulación; mientras que las no fraccionadas intervenían en dos puntos. Las fraccionadas al ser estructuras con una cadena más corta, hacen que tenga más selectividad y por tanto se reduzcan los efectos secundarios.⁽¹⁾

Con el paso de los años las heparinas se han convertido en uno de los fármacos más usados a nivel mundial para el tratamiento cardiovascular debido al aumento progresivo en la edad de las personas debido a los avances en medicina. Es el segundo medicamento procedente de fuentes naturales usado a nivel mundial después de las insulinas⁽²⁾. Tal es este hecho, que en 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el centenario del descubrimiento de la heparina, llegó a decir lo siguiente sobre las heparinas: "hoy no se entendería buena parte de la mejora sanitaria sin este fármaco".^(3,4)

En cuanto a su estructura, la heparina forma parte de la familia de los glicosaminoglicanos (GAG), los cuales tienen que estar muy sulfatados, como se muestra en la figura 1. Esta familia se caracteriza por ser polisacáridos polianiónicos, polidispersos y lineales, gracias a los cuales se han podido usar como agentes terapéuticos.⁽⁵⁾ Para su actividad es necesario la existencia de un pentasacárido como se muestra en la figura 1, que más tarde hablaremos de este. La estructura de los GAG es muy compleja y de hecho se puede observar en la gran cantidad de funciones que tienen en el organismo, entre las que se encuentran⁽⁶⁾:

- Funciones en la señalización y el desarrollo
- Coagulación sanguínea
- Cáncer
- Inflamación
- Cicatrización de heridas

Se engloban desde pequeñas estructuras como el hialuronano, hasta grandes estructuras como es el caso de la heparina o Heparán Sulfato (HS).^(4,5,3)



La heparina y el HS son unas estructuras muy similares cuya biosíntesis es común; pero estructuralmente son diferentes, tanto en su localización como en sus funciones (5). Ambas son GAGs en la cual se repiten los disacáridos ácido D-glucurónico (GlcA) o ácido L-idurónico (IdoA) y N-Acetilglucosamina (GlcNA) (7), aunque presentan las siguientes diferencias importantes (4):

1. El HS se expresa abundantemente en la superficie de las células de mamíferos, en la matriz extracelular; mientras que la Heparina se localiza en mayor proporción en el interior de las células
2. En relación a su estructura, La heparina se encuentra mucho más sulfatada que el HS. En el caso de la heparina hay un promedio de 2,6 grupos sulfo; mientras que en el HS 0,6 grupos sulfo. Además, la cantidad de IdoA por unidad de disacárido en la heparina es de 80-90%; mientras que en el HS es de 20%
3. Sus funciones. El HS participa en procesos biológicos como controlar la angiogénesis, desarrollo embrionario, respuesta inflamatoria, metástasis tumoral y coagulación sanguínea. Mientras que la heparina tiene una función anticoagulante bastante más destacada.

Esto hace que sean estructuras con un peso molecular muy elevado, hecho que obliga a utilizar la vía intravenosa o subcutánea para su administración. Por vía oral no se absorbería por lo que no ejercería su acción en la diana.

La heparina es almacenada en mastocitos y esta es liberada en la desgranulación de los mastocitos en aquellos lugares donde se produce una lesión o respuesta alérgica, junto con la histamina. Por lo que se puede pensar que tiene dos funciones destacadas: anticoagulante y protección frente a bacterias y cuerpos extraños.

Su principal función es disminuir la capacidad de coagulación de la sangre en situaciones donde el organismo coagula en exceso. Es decir, para o frena la trombosis. En resumen, son anticoagulantes de acción indirecta, teniendo un efecto hipocoagulante rápido y potente.

2.1. CASCADA DE COAGULACIÓN

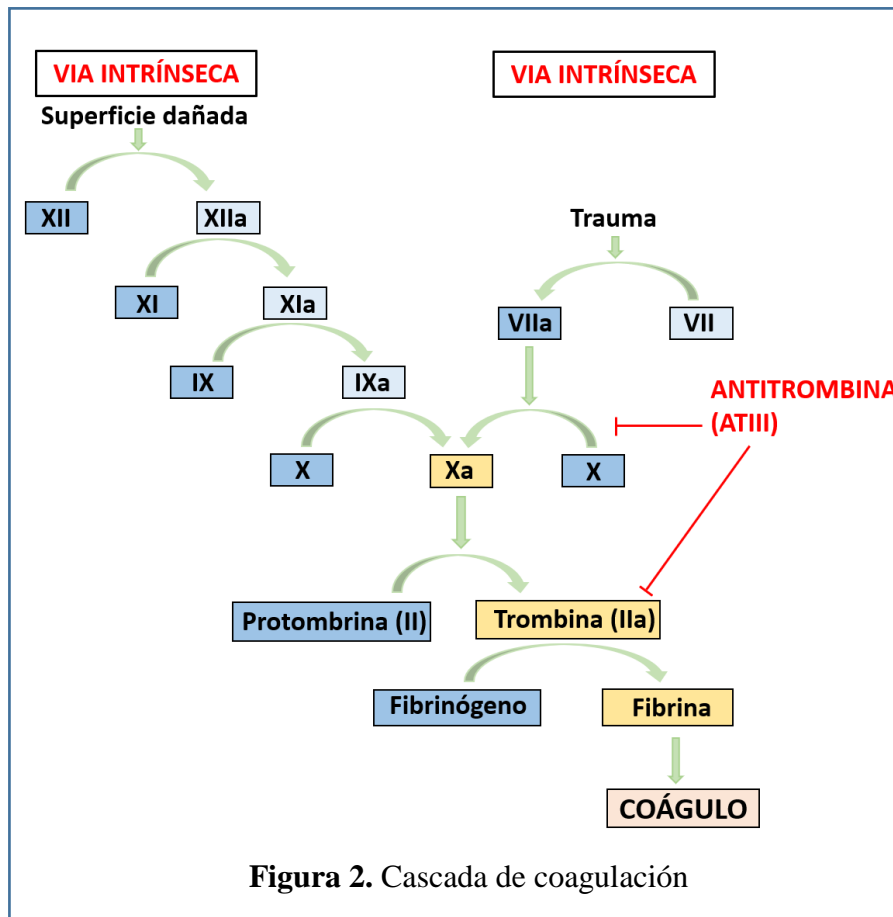
La coagulación es un proceso en el que la sangre en su estado líquido, va a ser convertida en una especie de polímero, el cual formará el coagulo sólido. Ocurre cuando actúa la trombina o factor IIa, que transforma el fibrinógeno (fibras solubles) en fibrina (fibras insolubles). En la figura 2 podemos observar varios factores de la coagulación designados con la numeración romana. Cada número contiene dos factores de coagulación; siendo los que no tienen la letra a, los factores de coagulación inactivados o también llamados zimógenos (precursores); y los que tienen la letra a, son los factores activados. ⁽⁸⁾

Es una cascada de activación, en la cual una pequeña activación de un factor lleva a la activación de muchos más factores, es decir, la señal se amplifica y se retroalimenta positivamente formando cada vez más factores de coagulación activados. Al ser una cascada tan potente, es necesario la presencia de inhibidores ya que si no toda la sangre de nuestro cuerpo solidificaría. El inhibidor más importante es la antitrombina III (ATIII), la cual va a neutralizar todos los factores de coagulación, que son serinproteasas. ⁽⁸⁾

Además, existen dos rutas para la cascada de coagulación ⁽⁸⁾:

- Vía extrínseca o in vivo: Es la ruta que ocurre fisiológicamente en nuestro cuerpo cuando hay una lesión en nuestros tejidos. Expone la sangre al factor tisular (FT), procedente del subendotelio o de las células no vasculares, los cuales de normal no están en la sangre o endotelio. Este FT va a actuar sobre el factor inactivado VII, formando el factor activado VIIa y por tanto, iniciando la cascada de coagulación hasta activar una pequeña cantidad de trombina.
- Vía intrínseca o de contacto: Es una vía de amplificación de la coagulación. Una vez que se ha producido la trombina por la vía extrínseca, esta trombina además de formar el coagulo, también va a potenciar la activación de esta vía intrínseca, potenciando la activación de los factores que forman parte de esta vía, y por tanto ampliándola. Además esta vía también puede comenzar con un daño endotelial, activando el factor XII, que junto con otras moléculas activa a otros factores hasta activar al factor IX, el cual era muy potenciado por la trombina activada por la vía extrínseca.

Por tanto, lo que ocurre es que una vía activa a la otra, es decir, la vía extrínseca activa a la vía intrínseca y se genera una gran amplificación de la coagulación. Ambas vías convergen en el factor X. ⁽⁸⁾



2.2. CRISIS DE LAS HEPARINAS 2008

La heparina se lleva utilizando como medicamento antitrombótico desde la década de 1930. Tanto su aislamiento como su proceso de fabricación no han cambiado mucho desde aquel entonces. En 1950, la USP (Farmacopea de EEUU) creó una monografía para la heparina con el fin de garantizar la identificación, calidad, pureza, eficacia y potencia de esta. Con esto se garantizaba a los administradores y a los pacientes que recibían estas heparinas, que eran de buena calidad. ^(3,7)

Pero en 2008, se detectó un fallo en este sistema, ya que se detectaron varias muertes producidas por la adulteración de los productos de la heparina. Esta adulteración pasó todos los filtros establecidos en la monografía, y por eso llegó al mercado y a administrarse a pacientes. Esto se debía a que la cadena de suministro de los tejidos para obtener la heparina en los mataderos, carecían de mucha regulación según las Good Manufacture Practice (GMPc). ^(3,7)

Los materiales de origen animal pueden contener agentes infecciosos y priones, que producen la transmisión potencial de enfermedades víricas. ^(3,7)

Los estudios determinaron que el contaminante era el sulfato de condroitina, que estaba sobre-sulfatado respecto a su comercialización normal. A raíz de esto se añadieron otras pruebas más estrictas para detectar este tipo de adulteraciones, como son la electroforesis capilar y resonancia magnética nuclear de protones. ^(3,7)

Lo complejo de esto es que para identificar la heparina no hay un patrón estándar, ya que es una mezcla compleja de polisacáridos altamente sulfatados. Cada monosacárido que forma parte de la heparina puede ser sulfatado de distintas formas en su biosíntesis, lo que hace que pueda haber una gran heterogeneidad estructural.

Hasta ahora se están obteniendo de los tejidos en los que se han obtenido de forma biológica, pero para reducir estos problemas se está intentando sintetizar mediante síntesis química o quimioenzimática.^(3,7)

3. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Conocer la historia de la heparina
- Conocer su estructura-actividad, sus funciones y su mecanismo de acción
- Síntesis de las heparinas, considerando la síntesis biológica, química y quimioenzimática.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la elaboración de este proyecto de fin de grado hemos realizado una revisión bibliográfica de artículos científicos. Hemos usado bases de datos como PubMed, ScienceDirect, libros de farmacología como el de Rang y Dale (7ª edición). Para ayudarnos en la búsqueda, hemos usando palabras clave como “heparina”, “síntesis química”, “síntesis quimioenzimática”, “Biosíntesis”, “mecanismo acción heparinas”. Además, para la realización de todas las figuras, hemos utilizado el programa “PowerPoint” y para la realización de todas las estructuras químicas hemos utilizado el programa “ChemSketch”

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. MECANISMO DE ACCIÓN

5.1.1. HEPARINAS NO FRACCIONADAS (HNF)

Es una mezcla de glicosaminoglicanos extraída del hígado de cerdo o bovino más frecuentemente. Es la forma menos procesada obtenida del GAG natural que procede de la purificación del tejido animal. Tiene carga negativa y un peso molecular medio de 15 kd. En su estructura tiene que haber si o si un pentasacárido que es el que se va a unir a la ATIII como se mostraba en la figura 1 y además tiene que tener como mínimo 18 secuencias de sacáridos. En el apartado de síntesis hablaremos más sobre este pentasacárido.⁽⁸⁾

Mecanismo de acción:

La Heparina lo que hace es unirse a la antitrombina III (ATIII), produciendo un cambio conformacional en ella que hace que aumente su actividad inhibitoria sobre los factores de coagulación IIa (trombina) y Xa principalmente; ver figura 3. No será el caso de las heparinas de bajo peso molecular, como veremos posteriormente. Es decir, actúa de forma indirecta al unirse a la ATIII⁽³⁾

Para acelerar la inactivación de la trombina o factor IIa por la ATIII es necesario que se forme un complejo terciario entre la heparina, ATIII y el factor IIa o trombina, como se puede observar en la figura 3 ⁽⁸⁾.

En el caso de la inhibición del factor Xa, no hace falta que se forme el complejo terciario, si no que bastaría con el cambio conformacional producido al unirse la heparina a la ATIII. ^(3,8)

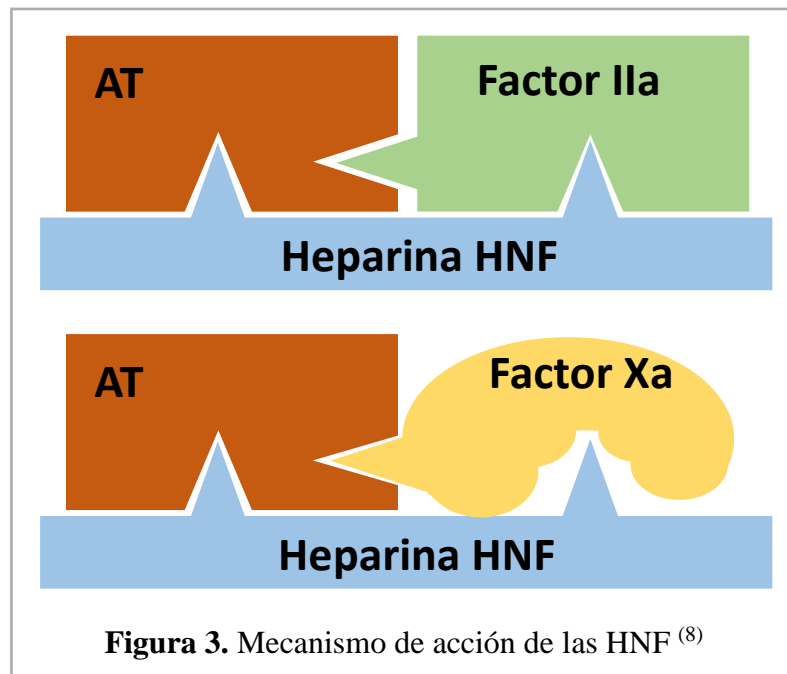


Figura 3. Mecanismo de acción de las HNF ⁽⁸⁾

El inconveniente del mecanismo de las HNF es la imposibilidad del complejo ATIII-HNF de inhibir a los factores de coagulación ya unidos en el coagulo .Otro inconveniente es que por su gran heterogeneidad en su estructura (al ser tan grande), puede ocurrir que algunas cadenas de la heparina se unan a otras proteínas plasmáticas, y estas asociaciones van a producir efectos adversos como por ejemplo efectos sobre el metabolismo óseo (osteoporosis, trombocitopenia inducida por heparina (HIT)) o incluso un efecto tan potente como anticoagulante que se requiera monitorización. ^(3,8)

La gran cantidad de cargas negativas que tiene la heparina, hace que se una a muchas proteínas plasmáticas como son la vitronectina, fibronectina, lipoproteínas, fibrinógeno, PAF4 (factor plaquetario 4), produciendo una disminución de la heparina disponible para unirse a la antitrombina III. Este efecto de unirse a otras proteínas varía mucho entre las personas, de ahí que el efecto anticoagulante sea muy variable en distintas personas a las que se le aplica la misma dosis. ⁽³⁾

El tiempo de semivida de las heparinas va a variar en función del tamaño de la molécula y de la dosis que administremos.

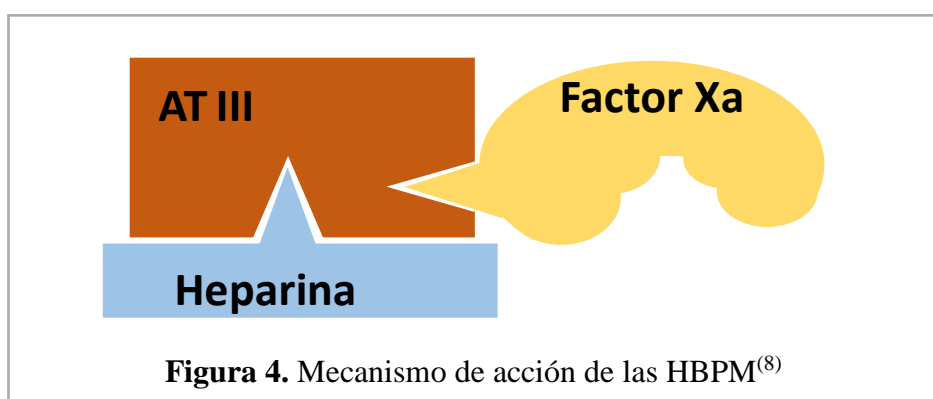
El problema de las heparinas es que van a necesitar un control estricto para evitar que haya una sobredosificación o una subdosificación. Este control solo se hace en caso de que el efecto buscado sea anticoagulación rápida; ya que si es solo un tratamiento preventivo frente al tromboembolismo venoso, no haría falta este control. ⁽⁹⁾

5.1.2. HEPARINAS FRACCIONADAS O DE BAJO PESO MOLECULAR (HBPM)

Estas heparinas proceden de las heparinas no fraccionadas, y se han obtenido cadenas más cortas, de menor peso molecular y con menos cargas negativas. Esto ocurre por escisión química o también por escisión enzimática controlada de las heparinas no fraccionadas mediante una reacción de despolimerización. Tienen que tener mínimo el pentasacárido necesario para inhibir la coagulación. ^(3,8)

Estas moléculas van a tener un efecto más predecible que las no fraccionadas; de este modo se reducirán los efectos adversos producidas por las HNF y por tanto, requerirán menor monitorización de las dosis. Esto llevo a que las HBPM sustituyeran a las HNF en la clínica. ^(3,8)

Estas van a ser capaz de unirse solo al factor Xa, es decir, no van a unirse al factor IIa o trombina, ya que su cadena al ser más corta, no alcanza para unirse a ambas ^(3,8). Ver figura 4.



5.2.2. HEPARINAS DE ULTRABAJO PESO MOLECULAR

En el año 2000 se dio un paso más en la obtención de heparinas y se obtuvieron heparinas con un peso molecular aún más bajo, utilizando métodos químicos sintéticos. Surge ante la necesidad de obtener heparinas que produjesen aún menos efectos secundarios, pero buscando siempre que el efecto anticoagulante siguiese siendo efectivo o mejor.

El problema de estas heparinas es su elevado coste, hecho que ha llevado a que su uso no sea muy amplio en el mundo. Consigue una baja proporción beneficio-coste. ^(3,8)

5.2.3. ANTIDOTO. PROTAMINA

En caso de intoxicación con anticoagulantes tipo heparina, el tratamiento de elección va a ser la protamina.

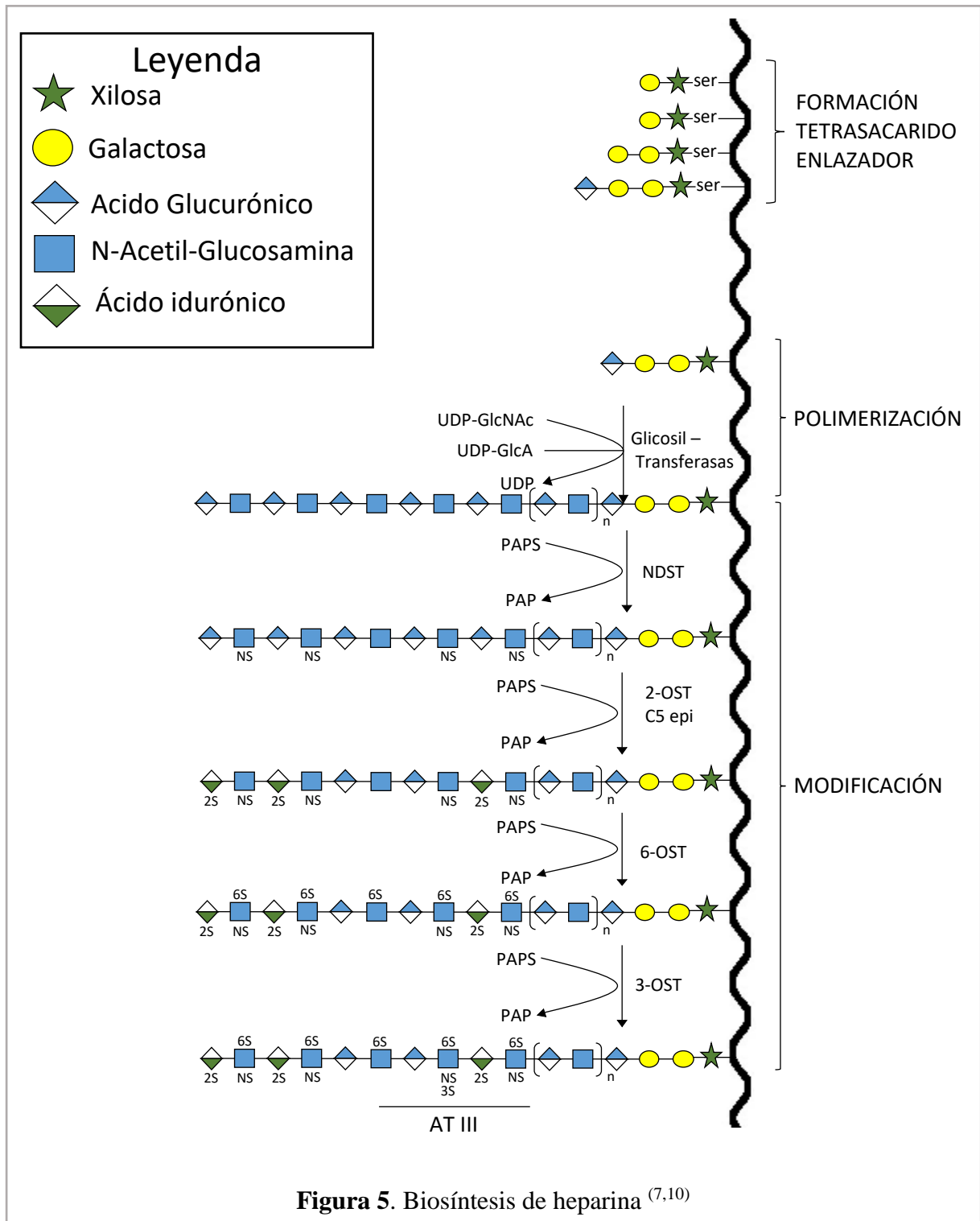
Esta aporta grupos catiónicos básico que neutralizan los grupos aniónicos ácidos de la heparina. Se tiene que administrar vía intravenosa.. Solo se debe usar siempre que no hayan pasado ocho horas desde la intoxicación. Tampoco se debe administrar más de 50 mg en dosis única.

5.2. SÍNTESIS DE HEPARINAS

5.2.1. BIOSÍNTESIS

La síntesis de la HP y el HS es prácticamente la misma. Consta de 3 fases (figura 5) ^(3,5,6,7,10,11).

1. Formación del tetrasacárido enlazador
2. Polimerización
3. Modificación



FORMACIÓN DEL ENLAZADOR

Comenzamos con la primera etapa, que consiste en la formación de un tetrasacárido enlazador que se encuentra unido a una serina de una proteína del núcleo, llamada serglicina. La biosíntesis empieza en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi de los mastocitos, donde tiene lugar la adición progresiva de los cuatro monosacáridos que formarán ese tetrapéptido, los cuales son xilosa (Xyl), Galatosa (Gal), Galactosa y Acido glucurónico (GlcA). En la formación de esta cadena intervienen 4 enzimas^(3,5,6,7,10,11):

- Xilosiltransferasa (XylT): encargada de unir la molécula de xilosa al residuo de serina.
- B-4 galactosiltransferasa (GalT1): añade el residuo de Galactosa
- B-3 galactosiltransferasa (GalT2): añade otro residuo de Galactosa
- B-3 Glucuronosiltransferasa (GlcAT I): añade un residuo de GlcA

La heparina solo se sintetiza en la proteína del núcleo serglicina. En cambio el HS se puede formar en muchas otras proteínas del núcleo, como por ejemplo proteínas de la familia sidecan y Glipican.

Una vez actúan las cuatro enzimas, el tetrapéptido enlazador está listo para su siguiente paso. Entramos por tanto en la fase dos, la polimerización.

POLIMERIZACIÓN

La polimerización es la etapa en la que actúan las enzimas glicosiltransferasas, cuya función es alargar la cadena del GAG, adicionando alternativamente residuos de GlcA y GlcNA. Para ello necesitan estar activados por uridina difosfato (UDP). De esta forma se consigue alargar la cadena en n veces disacáridos de GlcA y N-AcetilGlucosamina (GlcNA). Hasta ahora, el esqueleto de polisacáridos no está sulfatado y es en la fase tres donde ocurre la sulfatación^(3,5,6,7,10,11).

MODIFICACIÓN

La fase de modificación es una de las más importantes ya que es la que va a conseguir que el GAG consiga residuos sulfatados, necesarios para la unión a la ATIII. En general lo que hace es modificar los disacáridos de GlcA y GlcNA para obtener diferentes residuos que ahora veremos.

La primera enzima en actuar es la NDST (N-desacetilasa/N-sulfotransferasa) que modifica las unidades de GlcNA, transformándolas en N-sulfoglucosamina (GlcNS)^(3,5,6,7,10,11).

Las siguientes enzimas son las C5-epimerasa y las O-sulfotransferasas (OST). Las enzimas C5-epimerasa y 2-O-Sulfotransferasa (2-OST) actúan en conjunto. Primero actúa la C5-epimerasa, transformando algunas GlcA en IdoA (Ácido idurónico) y luego actúa la 2OST introduciendo en 2 el grupo sulfo para formar IdoA2S. La C5-epimerasa in vitro hace esta transformación de forma reversible, pero in vivo no. Esto se debe a la actuación concurrente de la 2OST, que bloquea la actividad reversible de la epimerasa C5 por la creación de impedimento estérico. En pocos casos, la 2-OST va a actuar sobre el GlcA para formar GlcA2S^(3,5,6,7,10,11).

Los residuos de GlcNS formados por la NDST van a ser modificados ahora por la 6-OST para formar GlcNS6S. Y luego actúa la 3-O-Sulfotransferasa (3-OST) para formar GlcNS6S3S.

Por tanto, como podemos observar, es la enzima NDST la que marca las unidades en las que se va a producir la sulfonación y la epimerización ⁽⁵⁾.

Las sulfotransferasas, para añadir ese resto sulfatado a la estructura GAG, necesitan de un donante de grupo sulfo universal, llamado PAPS (3'-fofoadenosina-5'-fofosulfato) que transfiere ese grupo sulfo a un grupo hidroxilo o amino específico de la estructura GAG ⁽¹⁰⁾.

AMPLIACIÓN DE LAS ENZIMAS

➤ **GLICOSILTRANSFERASA**

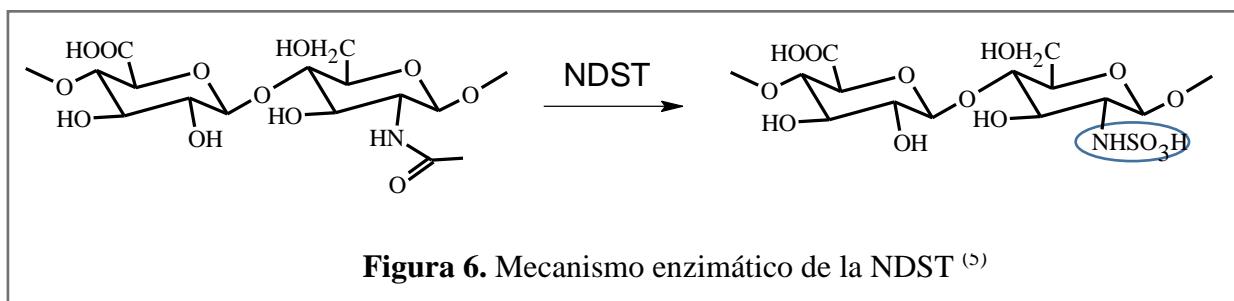
Gracias a la expresión de estas enzimas de forma recombinante, se ha conseguido avanzar bastante en la síntesis enzimática de polisacáridos y oligosacáridos de longitudes definidas. Es la encargada de realizar la fase de polimerización.

Las glicosiltransferasas utilizan para catalizar esta reacción azúcares activados por UDP. De esta forma, cataliza la reacción en la que el UDP-azúcar (UDP-GlcA o UDP-GlcNA) reacciona con el sustrato, liberando el UDP. De esta forma se sintetiza la cadena del glicosaminoglicano sobre la que posteriormente actuarán las demás enzimas para conseguir la especificidad por la antitrombina II ^(5,6,10,11).

➤ **NDST (N-DESACETILASA/N-SULFOTRANFERASA)**

La enzima NDST tiene cuatro isoformas, numeradas de uno a cuatro. La NDST-1 se piensa que es esencial. Al tener dos actividades, es lógico que la N-sulfonación va a estar restringida y acoplada al residuo en el que se produzca la N-desacetilación. Va a modificar las unidades de GlcNA, para obtener GlcNS como se muestra en la figura 6

Las cuatro isoformas son proteínas de membrana de tipo dos cuya cola citoplasmática es corta, el dominio transmembrana y una importante región luminal, la cual contiene dos sitios activos para realizar las dos actividades que realiza esta enzima, la N-Desacetilasa y la N-sulfotransferasa ^(5,6,10,11).



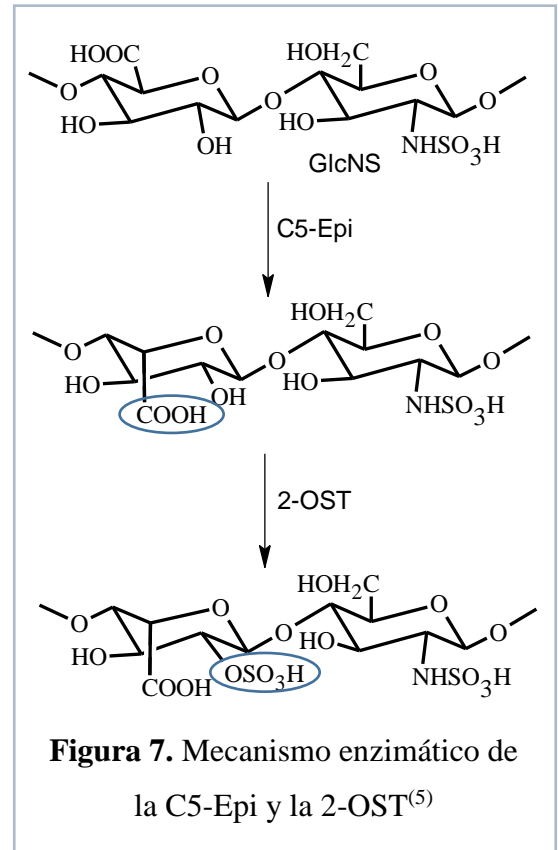
La presencia de grupos N-sulfo resulta un punto clave para la posterior introducción de grupos O-sulfo y para la epimerización, por lo que esta enzima es la que controla la formación de los dominios posteriores ⁽¹⁰⁾.

➤ C5-EPIMERASA

Se ha encontrado una sola isoforma de esta enzima, la cual se ha observado en el genoma murino, es decir, de roedores como ratas y ratones. Están localizadas en el cromosoma 9. También son proteínas de membrana de tipo dos.

La actividad de la enzima se ve reducida cuando no se acoplaba con la 2-OST, ya que sin esta, la C5-epimerasa se encontraba en el retículo endoplasmático pero no era capaz de trasladarse al Golgi, lugar en el que se produce la síntesis de la heparina. La inclusión del plásmido que expresa la 2-OST, producía que la C5-epimerasa se trasladara al Golgi.

Esta enzima transforma los residuos de GlcA en IdoA, pero solo aquellos que se encuentran al lado de residuos N-sulfatados, por eso decíamos que la NDST marca la estructura de la heparina. Como hemos visto antes, esta enzima en la síntesis de heparinas actúa en conjunto con la 2-OST, lo que hace que su actuación sea irreversible, al introducirse de forma seguida el grupo 2-O-sulfo, como se puede observar en la figura 7^(5,6,10,11).



➤ 2-O-SULFOTRANSFERASA

Solo hay una isoforma. Puede actuar sobre los residuos de GlcA e IdoA (mostrando más preferencia por este), pero tienen que estar junto a un residuo N-sulfo del GlcNS aun sin el grupo 6-O-sulfo.

El mecanismo consiste en que cataliza la transferencia de grupo sulfato al carbono 2 del GlcA o del IdoA, dando lugar al ácido 2-O-sulfoglucurónico (GlcA2S) o el ácido 2-O-Sulfoidurónico (IdoA2S) como vemos en la figura 7. Tiene cinco veces más afinidad por IdoA que por GlcA^(5,6,10,11).

➤ 6-O-SULFOTRANSFERASA

Esta enzima cataliza la transferencia del grupo sulfo al carbono 6 del GlcNS o GlcNA, dando lugar a GlcNS6S o GlcNA6S como se observa en la figura 9. Se han encontrado tres isoformas, las cuales se han demostrado que tienen una gran afinidad por los residuos de GlcNA principalmente^(5,6,10,11).

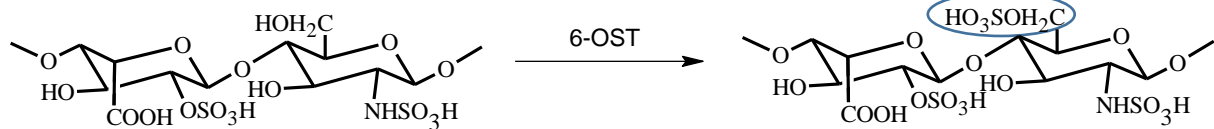


Figura 8. Mecanismo enzimático de la 6-OST ⁽⁵⁾

➤ 3-O-SULFOTRANSFERASA

La 3-OST cataliza la transferencia del grupo sulfo al carbono 3 del residuo de glucosamina, es decir, el GlcNAc. Presenta siete isoformas

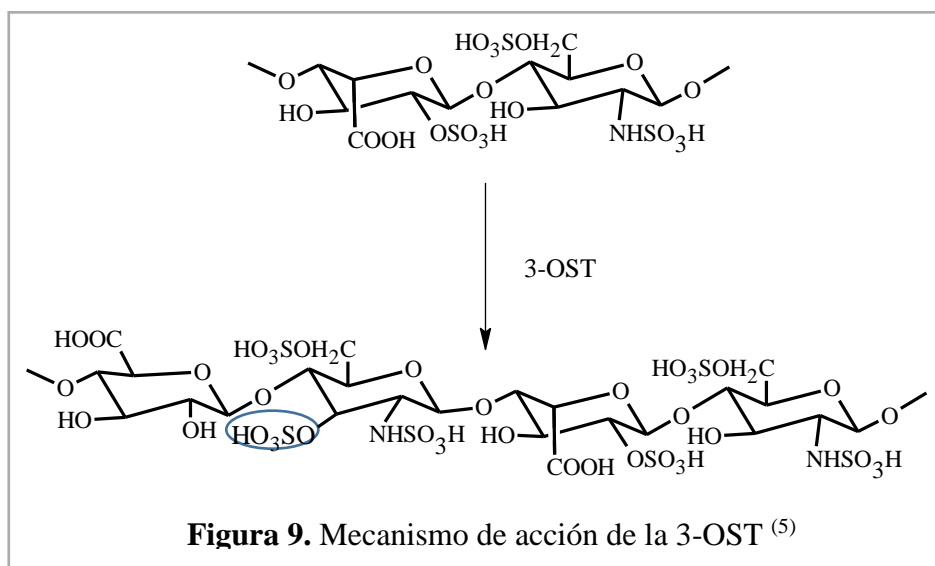


Figura 9. Mecanismo de acción de la 3-OST ⁽⁵⁾

➤ 3'-FOSFOADENOSINA-5'-FOSFOSULFATO (PAPS)

PAPS es una molécula cuya función es servir como cofactor de las enzimas de la fase de modificación, es decir, la NDST y las sulfotransferasas. Es un donante de grupos sulfo, transfiriendo el grupo sulfo a la cadena de GAG para formar la heparina. Para su formación vamos a ver dos tipos de obtención, la biosintética y una alternativa más barata a nivel de laboratorio ^(6,10,11).

Su biosíntesis cuenta con dos pasos, primero se tiene que sintetizar APS y finalmente el PAPS (ver figura 10)⁽⁶⁾.

1. Para ello partimos de ATP, el cual gracias a la ATP-sulfotransferasa, forma APS (fosfosulfato de adenosina) + PPi (pirofosfato). Este PPi mediante retroalimentación negativa, produce inhibición de la ATP-Sulfotransferasa. Como no queremos que ocurra esto, añadimos pirofosfatasa, de tal forma que hidroliza este PPi en dos moléculas de fosfato inorgánico.
2. El APS, junto con la enzima APS quinasa, produce la transferencia de un grupo fosfato a la posición 3 del APS, obteniéndose nuestro producto final, PAPS.

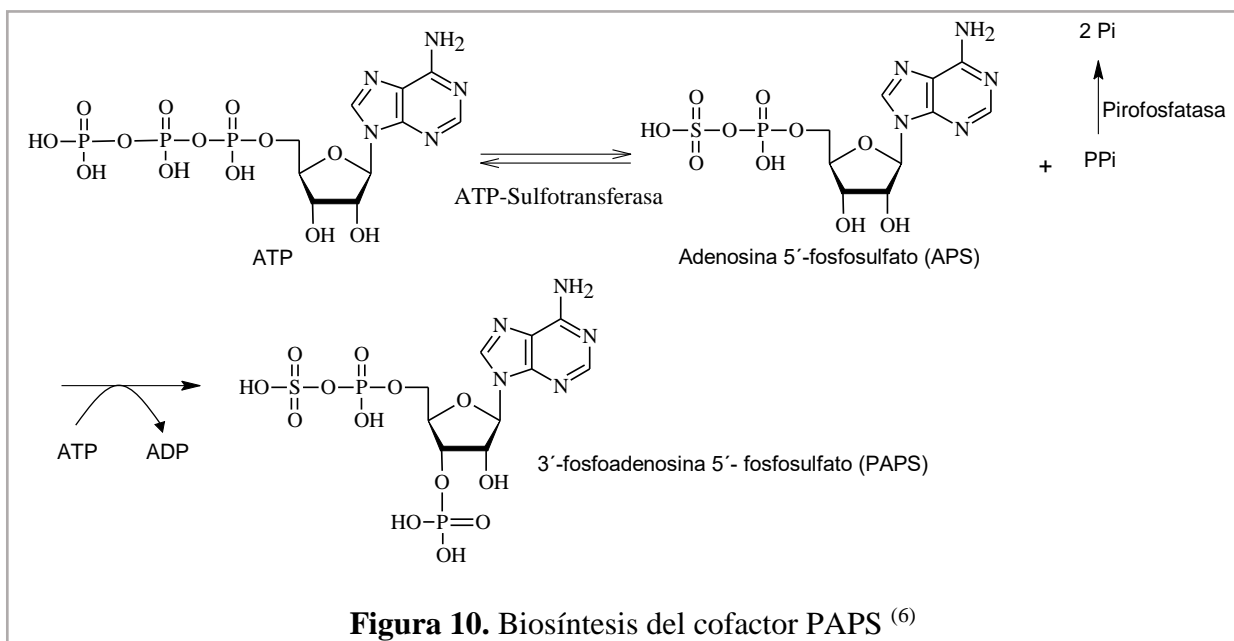


Figura 10. Biosíntesis del cofactor PAPS ⁽⁶⁾

A nivel de laboratorio, la generación de este PAPS es muy caro, por lo que se intentó obtener métodos más económicos. Se llegó a un sistema de regeneración de PAPS basado en el uso de la enzima arilsulfotransferasa-IV (AST-IV). Esta enzima, de forma natural cataliza la transferencia de grupos sulfo del PAPS a un fenol. Pero se observó que a altas concentraciones de sulfato-p-nitrofenilo, la reacción se invertía, por lo que se conseguía transferir el grupo sulfo del sulfato-p-nitrofenilo al PAP, obteniendo PAPS, el cual es el donante universal para nuestras sulfotransferasas en la síntesis de GAG/heparina.

Esta regeneración, produce un producto derivado del sustrato inicial, el p-nitrofenol. Este producto es fácilmente manipulable e identificable, ya que es de color amarillo y se puede detectar por espectroscopia a una longitud de onda de 400 nm ^(6,10,11).

5.2.2. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA

La síntesis química, consiste en una serie de pasos repetitivos de protección, activación, acoplamiento y desprotección, que hacen que resulte un desafío impresionante para la preparación de GAGs más grandes del pentasacárido. Un ejemplo de esto es el fármaco Arixtra (fondaparinux), que es un pentasacárido anticoagulante, el cual ha requerido hasta 60 pasos de síntesis, obteniendo un rendimiento muy bajo ⁽⁴⁾. Además durante el proceso de síntesis se requieren numerosos pasos de eliminación de productos tales como isómeros no deseados o productos secundarios no deseados ⁽⁶⁾.

Por tanto, la multitud de pasos, junto con los bajos rendimientos y altos costos, hacen que la síntesis química de cadenas de heparina no sea usada como tecnología actual para la obtención de estas, ya que limita mucho la aplicación clínica ⁽⁷⁾.

Dada que la síntesis química resulta demasiado compleja y se obtienen fármacos bastante caros, se decidió dar otro enfoque a la síntesis de Heparina/Heparán Sulfato. Este método es la síntesis quimioenzimática, que consiste en utilizar la regioselectividad alta de las enzimas que participaban en la biosíntesis. Es verdaderamente útil para estas estructuras tan grandes y sulfatadas ⁽⁵⁾.

Al ser reacciones en las que intervienen enzimas, vamos a tener una alta quimioespecificidad, regioespecificidad y estereoespecificidad. Para ello se usa tecnología recombinante, gracias a la cual se han conseguido expresar y clonar las glicosiltransferasas y las enzimas biosintéticas que intervienen en la biosíntesis de la heparina y derivados ⁽¹⁰⁾.

La síntesis quimioenzimática se basa en el proceso de biosíntesis. Se han descrito varias estrategias de síntesis quimioenzimática, en las cuales se han intentado solventar algunos problemas que se daban en la obtención biosintética de estas.

Esta síntesis quimioenzimática se ha conseguido gracias a la expresión de las enzimas explicadas anteriormente en la biosíntesis, en determinados organismos como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Organismos en los que se expresan las enzimas⁽¹⁰⁾

ENZIMA	ABREVIATURA	ORGANISMO EXPRESADO
N-Acetil-D-Glucosaminiltransferasa	KfiA	<i>Escherichia coli K5</i>
Heparosan Sintasa 1 y 2	PmHS1 y 2	<i>Pasteurella multocida</i>
C5-Epimerasa	C5-Epi	<i>Cricetulus griseus</i>
2-O-Sulfotransferasa 1	2OST-1	<i>Mus musculus</i>
6-O-Sulfotransferasa 1	6OST-1	
6-O-Sulfotransferasa 3	6OST-3	
3-O-Sulfotransferasa 1	3OST-1	
3-O-Sulfotransferasa 5	3OST-5	
3-O-Sulfotransferasa 3	3OST-3	

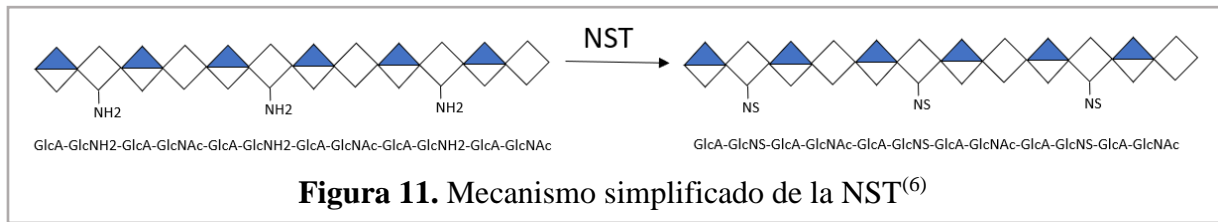
FORMACIÓN DEL OLIGOSACÁRIDO CON UN TAMAÑO DEFINIDO

Para empezar, se necesita un cebador, el cual va a ser un disacárido del cual hay bastante disponibilidad en el comercio. A partir de este, se va a alargar de forma controlada usando dos glicosiltransferasas, obtenidas a partir de dos bacterias⁽⁶⁾:

- Gen Kfi del *E.coli*
- GenPmHS2 del *Pasteurella multocida*

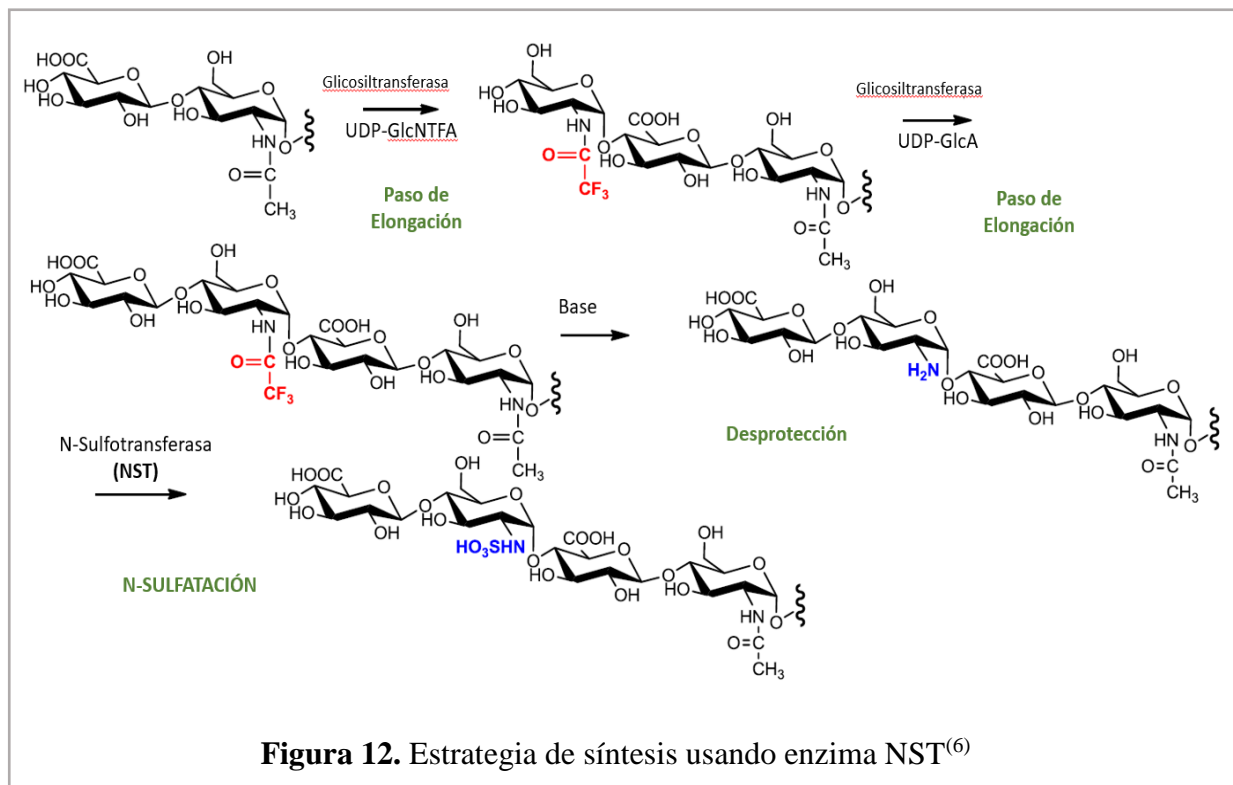
N-SULFATACIÓN EN SITIOS ESPECÍFICOS

En este caso, vamos a usar la enzima N-sulfotransferasa. No se usa NDST como en la biosíntesis ya que se obtienen varios productos de síntesis, disminuyendo el rendimiento de esta. Como se ve en la figura 11, La NST consigue convertir un residuo de GlcNH₂ en un residuo de GlcNS, obteniendo un solo producto y por tanto, mejorando el rendimiento. Cuanto más pura sea nuestra reacción, más rendimiento obtendremos ya que harán falta menos pasos de purificación, que en general es donde se pierde rendimiento.



El problema que se encuentra con la NST es la complejidad de añadir residuos GlcNH₂ sobre el que va a actuar una vez alargada la cadena. Este se solventó usando glicosiltransferasas expresadas en *E. coli* y un donante UDP no natural como sustrato de este para elongar la cadena. Este donante es el UDPGlcNTFA (Glucosamina trifluoroacetilada) que presenta mucha afinidad como sustrato para la glicosiltransferasa. El oligosacárido resultante que tiene el residuo GlcNTFA en el extremo no reductor también es muy bueno como sustrato para la siguiente glicosiltransferasa expresada en *Pasteurella multocida* (pmHS2); de esta forma se puede continuar perfectamente el alargamiento de la cadena de oligosacáridos. A continuación lo que tiene lugar es un paso de desprotección de la molécula en condiciones básicas suaves, en el cual se va a eliminar el grupo trifluoroacetilo para obtener GlcNH₂, el cual es el sustrato para la NST. Esta actuará transformándolo en GlcNS, llegando a obtener el oligosacárido N-sulfatado⁽⁶⁾.

Además estos productos obtenidos de este proceso, son fácilmente purificables, por lo que vamos a obtener un alto rendimiento.



6. CONCLUSIÓN

Las heparinas, actualmente tienen una alta demanda, hecho que ha llevado a investigarlas mucho a lo largo de estos 100 años de existencia. Además, con la crisis de estas en 2008, se ha visto acelerado este proceso para obtener heparinas más seguras y eficaces.

El futuro de las heparinas se está enfocando en la obtención de fármacos que contenga únicamente la estructura del pentasacárido, con sus residuos sulfatados, necesario para unirse a la antitrombina. Se ha conseguido en el fármaco fondaparinux; pero el problema es la baja relación beneficio/costo. Esto se debe a que para su síntesis, se requerían alrededor de 60 pasos de síntesis, obteniendo un rendimiento de reacción muy bajo e insostenible económicamente.

Por ello, una alternativa para la biosíntesis y la síntesis química, es la síntesis quimioenzimática, la cual consigue expresar enzimas de la biosíntesis en determinados organismos como *E.coli* K5. Esto hace que se reduzca la matanza de los bovinos de los cuales se extraían las heparinas.

Además, es muy complicado controlar la estructura de las heparinas ya que las enzimas no tienen un orden lógico de actuación. Por ejemplo, la NDST va a marcar los sitios de sulfonación del GlcNA pero esta enzima no tiene porque actuar sobre todos los residuos GlcNA que se vaya encontrando. Por tanto, uno de los objetivos de la nueva síntesis, es la obtención de una estructura más estándar. Esto además, evitaría problemas como los que hubo en 2008.

7. BIBLIOGRAFIA

1. McLean J. The Discovery of Heparin. *Circulation*, 1959 [citado 8 de febrero de 2019]; 9:75-78.
2. Szajek A, Chess E, Johansen K, Gratzl G, Gray E, Keire D et al. The US regulatory and pharmacopeia response to the global heparin contamination crisis. *Nature Biotechnology*. 2016;34(6):625-630.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281424>
3. Oduah E, Linhardt R, Sharfstein S. Heparin: Past, Present, and Future. *Pharmaceuticals*. 2016;9(3):38.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27384570>
4. Zhang X, Pagadala V, Jester H, Lim A, Pham T, Goulas A et al. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin oligosaccharides and NMR analysis: paving the way to a diverse library for glycobiotologists. *Chemical Science*. 2017;8(12):7932-7940.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29568440>
5. Laremore T, Zhang F, Dordick J, Liu J, Linhardt R. Recent progress and applications in glycosaminoglycan and heparin research. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2009;13(5-6):633-640.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781979>
6. Zhou X, O'Leary T, Xu Y, Sheng J, Liu J. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2012;30(3):296-308.
Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10242422.2012.681852>
7. Zhou X, O'Leary T, Xu Y, Sheng J, Liu J. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2012;30(3):296-308.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26555370>
8. Ritter J.M.; R.J. Flower; G. Henderson. *Rang & Dale's Pharmacology*, 8e. Students and healthcare practitioners worldwide 2015. 294-305
9. Trejo I. C. Anticoagulantes: Farmacología, mecanismos de acción y usos clínicos. *Cuadernos de Cirugía*. 2004;18(1):83-90.
Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/274773394>
10. Suflita M, Fu L, He W, Koffas M, Linhardt R. Heparin and related polysaccharides: synthesis using recombinant enzymes and metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99(18):7465-7479.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26219501>
11. Liu J, Linhardt R. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin. *Nat Prod Rep*. 2014;31(12):1676-1685.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25197032>

12. Zhang X, Pagadala V, Jester H, Lim A, Pham T, Goulas A et al. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin oligosaccharides and NMR analysis: paving the way to a diverse library for glycobiochemists. *Chemical Science*. 2017;8(12):7932-7940.
Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/sc/c7sc03541a#!divAbstract>
13. Fu L, Suflita M, Linhardt R. Bioengineered heparins and heparan sulfates. *Advanced drug delivery reviews*. 2016; 97: 237-249.
Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X15002586?via%3Dihub>