

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**Enfermedad de Gaucher de inicio
en la edad pediátrica. Estudio de la
correlación genotipo-fenotipo, del
crecimiento de los pacientes y de la
respuesta al tratamiento
enzimático sustitutivo.**

SEGUNDO RITE GRACIA

Los Doctores D^a Pilar Giraldo Castellano, D. Antonio Baldellou Vázquez y D. Miguel Pocovi Mieras,

Acreditamos: Que D. Segundo Rite Gracia ha realizado bajo su dirección la memoria de la tesis doctoral titulada “Enfermedad de Gaucher de inicio en la edad pediátrica. Estudio de la correlación genotipo-fenotipo, del crecimiento de los pacientes y de la respuesta al tratamiento enzimático sustitutivo”, dando su conformidad para que sea oportunamente defendida y juzgada para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Zaragoza.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Zaragoza a seis de marzo de dos mil dos.

Pilar Giraldo Castellano

Antonio Baldellou Vázquez

Miguel Pocovi Mieras

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Pilar Giraldo Castellano, Antonio Baldellou Vázquez, Miguel Pocovi Mieras y José Luis Olivares López por su dirección, consejos y ánimo infatigable que han permitido hacer realidad esta tesis.

Al Dr. Manuel Giralt Raichs por su confianza, asesoramiento y estímulo permanente.

Al Dr. Jose Ignacio Labarta Aizpún por su inestimable colaboración en el análisis de todos los aspectos relacionados con el crecimiento.

A las Dras. Ana Cenarro y Pilar Alfonso por la realización de las determinaciones enzimáticas y genéticas.

A la Dra. Ana Guallar Labrador por su colaboración en la determinación de los factores de crecimiento similares a la insulina.

A los Dres. Angel Ferrández Longás, Esteban Mayayo Dehesa y Jose Ignacio Labarta Aizpún por enseñarme y transmitirme su pasión por la Endocrinología Pediátrica, lo que tanto me ha ayudado en la realización de este trabajo.

A los pacientes, sus familiares y médicos responsables de los mismos que nos han facilitado toda la información solicitada y que sin su colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

A mi familia por su apoyo, paciencia, comprensión y cariño demostrados durante el tiempo que ha durado este estudio, sin los cuales no hubiese podido llevarlo a término.

A Carmen por su constante apoyo.

A mis amigos que son muchos y verdaderos.

Y a todos aquellos que de algún modo han colaborado en hacer posible esta obra.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
<u>1. ASPECTOS HISTÓRICOS DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER</u>	4
<u>2- ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS</u>	7
<u>3. ASPECTOS ENZIMÁTICOS Y GENÉTICOS</u>	8
3.1 <i>La sustancia acumulada y patogénesis de la enfermedad</i>	9
3.2 <i>La β-glucosidasa ácida</i>	12
3.2.1 Características generales de la β -glucosidasa ácida	13
3.2.2 Propiedades cinéticas	14
3.2.3 Efectos de los fosfolípidos y glucoesfingolípidos cargados negativamente	15
3.2.4 Activación por saposinas	15
3.2.5 Propiedades del centro activo del enzima	16
3.2.6 Proceso postranslacional de la β -glucosidasa ácida	18
3.2.7 Saposinas A y C	18
3.3 <i>Bases moleculares de la enfermedad de Gaucher</i>	20
3.3.1 Organización genómica	20
3.3.2 Transcripción del gen de la glucocerebrosidasa	21
3.3.3 Mutaciones del gen de la glucocerebrosidasa	22
3.3.4 Distribución de mutaciones en la población	27
<i>Mutaciones en población de judíos ashkenazi</i>	28
<i>Mutaciones en población de origen no judío</i>	29
<i>Mutaciones en población española</i>	30
3.3.5 Características de las mutaciones más prevalentes	32
3.3.6 Correlación genotipo-fenotipo	37

	Página
<u>4. ASPECTOS CLÍNICOS</u>	
4.1 <i>Clasificación clínica</i>	41
4.2 <i>Enfermedad de Gaucher tipo I</i>	42
4.2.1 Frecuencia de la enfermedad	42
4.2.2 Manifestaciones clínicas más habituales	42
4.2.3 Examen clínico	43
4.2.4 Enfermedad esplénica	44
4.2.5 Enfermedad hepática	45
4.2.6 Enfermedad de la médula ósea	46
4.2.7 Manifestaciones hematológicas	47
4.2.8 Enfermedad ósea	48
<i>Radiología simple</i>	52
<i>Gammagrafía ósea</i>	52
<i>Tomografía computarizada</i>	53
<i>Densitometría ósea</i>	53
<i>Resonancia magnética</i>	54
4.2.9 Enfermedad pulmonar	57
4.2.10 Manifestaciones oculares y cutáneas	59
4.2.11 Otras manifestaciones no habituales	60
<i>Renales</i>	60
<i>Cardiacas</i>	60
<i>Enfermedad de Parkinson</i>	60
<i>Colitis</i>	60
<i>Enfermedades linfoproliferativas</i>	61
<i>Tiroideas</i>	61
4.2.12 Enfermedad de Gaucher y embarazo	61
4.2.13 Enfermedad de Gaucher. Crecimiento y desarrollo	62
4.2.14 Historia natural de la enfermedad de Gaucher tipo I y pronóstico	63
4.3 <i>Enfermedad de Gaucher tipo 2 y 3</i>	66
4.3.1 Frecuencia	66

	Página
4.3.2 Etiología y fisiopatología	66
4.3.3 Enfermedad de Gaucher tipo 2 (neuronopática aguda)	68
4.3.4 Enfermedad de Gaucher tipo 3 (neuronopática subaguda o crónica)	70
<u>5. ASPECTOS METABÓLICOS</u>	72
<i>5.1 Alteraciones lipídicas</i>	73
5.1.1 Glucosilceramida	73
5.1.2 Colesterol y lipoproteínas	73
<i>5.2 Alteraciones en proteínas y enzimas plasmáticas</i>	74
5.2.1 Transcobalamina	74
5.2.2 Ferritina	74
5.2.3 Inmunoglobulinas	75
5.2.4 Citocinas y Factor estimulante de colonias macrofágicas (M-CSF)	75
5.2.5 Factores de la coagulación y fibrinolisis	77
5.2.6 Hidrolasas lisosomales, enzima convertidora de angiotensina y lisozima	77
5.2.7 Fosfatasa ácida tartrato resistente	78
5.2.8 Quitotriosidasa	78
<u>6. ASPECTOS HISTOLÓGICOS</u>	80
<i>6.1 La célula de Gaucher</i>	80
<i>6.2 Bazo</i>	81
<i>6.3 Hígado</i>	81
<i>6.4 Ganglios linfáticos</i>	82
<i>6.5. Médula ósea</i>	82
<i>6.6 Sistema pulmonar y cardiovascular</i>	83

	Página
<i>6.7 Sistema renal</i>	83
<i>6.8. Sistema gastrointestinal</i>	83
<u>7. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER</u>	83
<i>7.1 Diagnóstico morfológico</i>	83
<i>7.2 Diagnóstico enzimático</i>	84
<i>7.3 Diagnóstico genético</i>	85
<i>7.4 Diagnóstico prenatal</i>	86
<u>8. TRATAMIENTO EN LA ENFERMEDAD DE GAUCHER</u>	87
<i>8.1 Tratamiento sintomático</i>	87
8.1.1 Enfermedad ósea	87
8.1.2 Enfermedad hematológica	89
<i>8.2 Tratamiento enzimático sustitutivo</i>	90
8.2.1 Fármacos utilizados	91
8.2.2 Indicaciones	91
8.2.3 Pautas de dosificación	92
8.2.4 Respuesta al TES	94
<i>Respuesta visceral</i>	95
<i>Respuesta hematológica</i>	95
<i>Respuesta esquelética</i>	96
<i>Respuesta en el retraso de crecimiento</i>	96
<i>Respuesta de la enfermedad pulmonar</i>	96
<i>Respuesta de la enfermedad neurológica</i>	97
<i>Influencia sobre la calidad de vida</i>	98
8.2.5 Efectos adversos relacionados con el TES	99
<i>8.3 Tratamiento anti-sustrato</i>	99

	Página
<i>8.4 Transplante de precursores hematopoyéticos</i>	100
<i>8.5 Terapia génica</i>	102
<u>9. PECULIARIDADES DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER EN LA INFANCIA</u>	103
OBJETIVOS	106
MATERIAL Y MÉTODOS	108
<u>1. MATERIAL</u>	109
<i>1.1 Diseño del estudio</i>	110
1.1.1 Aspectos demográficos	110
1.1.2 Variables	110
<i>Clínicas</i>	110
<i>Analíticas</i>	111
<i>Genéticas</i>	111
<u>2. MÉTODOS</u>	111
<i>2.1 Obtención de leucocitos</i>	112
<i>2.2 Medición de la actividad de β-glucocerebrosidasa ácida</i>	113
<i>2.3 Medición de la actividad enzimática de la Quitotriosidasa</i>	114
<i>2.4 Análisis de mutaciones</i>	114
<i>2.5 Determinación de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) y sus proteínas transportadoras (IGF-I total, IGF-I libre, IGFBP-3 y ALS total)</i>	115
<i>2.6 Genes relacionados con el crecimiento y expresión alterada</i>	116

	Página
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	118
3.1 <i>Características clínicas, analíticas y genéticas de la población estudiada previo al inicio del tratamiento</i>	118
3.1.1 Características demográficas	118
<i>Distribución porcentual por sexos y geográfica</i>	118
<i>Distribución por grupos de edad al diagnóstico</i>	118
3.1.2 Características clínicas	118
<i>Distribución porcentual en tipos I, II y III de la enfermedad</i>	118
<i>Tamaño hepático y esplénico</i>	119
<i>Afectación ósea</i>	119
<i>Otras manifestaciones</i>	119
3.1.3 Evaluación del crecimiento	119
3.1.4 Características analíticas	120
<i>Actividad de β-glucosidasa ácida</i>	120
<i>Presencia de alteraciones hematológicas</i>	120
<i>Presencia de alteraciones de la función hepática</i>	120
<i>Presencia de alteraciones en el perfil lipídico</i>	121
<i>Marcadores enzimáticos de actividad de la enfermedad</i>	122
<i>Análisis del sistema IGF-1/IGFBP-3/ALS</i>	122
<i>Genes relacionados con el crecimiento y expresión alterada</i>	123
3.1.5 Características genéticas	123
3.2 <i>Respuesta al TES</i>	124
3.2.1 Número de casos en tratamiento	124
3.2.2 Respuesta en las visceromegalias	124
3.2.3 Respuesta del crecimiento	124
3.2.4 Respuesta hematológica	124
<i>Hemoglobina</i>	124
<i>Recuento plaquetario</i>	125
3.2.5 Cambios en el perfil lipídico	125
<i>Colesterol total</i>	125

	Página
<i>HDL colesterol</i>	125
<i>Índice aterogénico</i>	125
3.2.6 Respuesta de los marcadores enzimáticos de actividad	125
<i>Fosfatasa ácida</i>	125
<i>Actividad de Quitotriosidasa</i>	125
3.2.7 Respuesta del sistema IGF-I - IGFBP-3 - ALS	126
ANEXO	127
RESULTADOS	138
<u>1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANALÍTICAS Y GENÉTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA ANTES DEL INICIO DEL TES</u>	138
<i>1.1 Características demográficas</i>	138
1.1.1 Distribución geográfica	138
1.1.2 Distribución por grupos de edad y sexo	138
<i>1.2 Características clínicas</i>	139
1.2.1 Distribución por tipos de enfermedad de Gaucher	139
1.2.2 Manifestaciones clínicas	139
<i>Visceromegalias</i>	139
<i>Afectación ósea</i>	141
<i>Otras manifestaciones clínicas</i>	141
<i>Características del crecimiento lineal</i>	141
<i>1.3 Características analíticas</i>	142
<i>Actividad de β-glucosidasa ácida</i>	142
<i>Alteraciones hematológicas</i>	144
<i>Alteraciones de las enzimas hepáticas</i>	144
<i>Perfil lipídico</i>	145
<i>Actividad de Quitotriosidasa</i>	146

	Página
<i>Factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs)</i>	
<i>y sus proteínas transportadoras</i>	153
<i>Genes relacionados con el crecimiento y expresión alterada</i>	156
<i>1.4 Score pronóstico en la población a estudio</i>	157
<i>1.5 Genotipo</i>	158
<u>2. RESPUESTA AL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SUSTITUTIVO</u>	160
<i>2.1 Número de casos en tratamiento</i>	160
<i>2.2 Respuesta en las visceromegalias</i>	161
<i>2.2.1 Hepatomegalia</i>	161
<i>2.2.2 Esplenomegalia</i>	163
<i>2.3 Respuesta en el crecimiento</i>	164
<i>2.4 Respuesta hematológica</i>	165
<i>2.4.1 Hemoglobina</i>	165
<i>2.4.2 Recuento plaquetario</i>	167
<i>2.5 Cambios en el perfil lipídico</i>	170
<i>2.6 Respuesta de los marcadores enzimáticos de actividad de la enfermedad</i>	172
<i>2.6.1 Fosfatasa ácida</i>	172
<i>2.6.2 Actividad de quitotriosidasa</i>	174
<i>2.7. Respuesta del sistema IGF</i>	175

	Página
DISCUSIÓN	177
<u>1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, ANALÍTICAS Y GENÉTICAS DE LA EG CON INICIO EN EDAD PEDIÁTRICA</u>	178
<u>2. RESPUESTA AL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SUSTITUTIVO</u>	204
CONCLUSIONES	212
BIBLIOGRAFÍA	215
TABLAS	254
FIGURAS	256

ABREVIATURAS

ALS: Subunidad ácido lábil

COX: Ciclooxygenasa

CSF: Factor estimulante de colonias

DDAVP: Desmopresina

Del: Delección

DEXA: Dual energy X ray absorptimetry

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EWGGD: Grupo europeo de trabajo sobre enfermedad de Gaucher

FEETEG: Fundación española para el estudio y terapéutica de la enfermedad de Gaucher

GC: Glucocerebrosidasa

GH: Hormona de crecimiento

GHBP: Proteína transportadora de GH

GHD: Déficit de hormona de crecimiento

IA: Índice aterogénico

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

IGFBP: Proteína transportadora de IGF

IL: Interleucina

Ins: inserción

Kb: Kilobase

Kda: Kilodalton

M-CSF: Factor de estimulante de colonias monocíticas

MTX: Metaxina

M-6-P: Manosa 6 fosfato

- ABREVIATURAS -

NGF: Factor de crecimiento neural

Pb: pares de bases

PK: Piruvato kinasa

PTH: Paratohormona

QCSI: Quantitative chemical shift imaging

QT: Quitotriosidasa

Rec: Recombinación

REEG: Registro Español de enfermedad de Gaucher

RM: Resonancia magnética

Sap: saposina

SDS: Standard desviation score

SSI: Índice de gravedad

SSIA: Índice de gravedad ajustado por edad

TC: Tomografía computarizada

TES: Tratamiento enzimático sustitutivo

TGF: Factor de crecimiento transformador

TNF: Factor de necrosis tumoral

TP: Tiempo de protrombina

TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activado

4-MU-Glc: 4-metilumbeliferilglucopiranosido

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS HISTÓRICOS DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER

En 1882, el investigador clínico francés Philippe Charles Ernest Gaucher describió el caso de una paciente con esplenomegalia que él identificó como un epitelioma (1), encontrando células anómalas de gran tamaño en el bazo. En breve aparecieron nuevas comunicaciones sobre pacientes con similares características clínicas, aplicándose el término de “Enfermedad de Gaucher” (EG) a estos pacientes. La impresión inicial sugería que los acúmulos de células grandes que aparecían en el bazo o en la médula ósea correspondían a una proliferación neoplásica probablemente de origen epitelial. Sin embargo a principios del siglo XX se invalida esta hipótesis cuando se establece la incidencia familiar del proceso (2). Además se comprobó que la edad en que los síntomas y signos de la enfermedad hacían acto de presencia variaba de forma considerable de unos pacientes a otros (3,4). La afectación neurológica en un paciente con características clínicas de EG se comunicó por primera vez en el año 1927 (5). Los cuadros neurológicos graves de aparición en los primeros años de vida se identificaron como el tipo 2 de la enfermedad mientras que la mayoría de los pacientes que no presentaban afectación neurológica eran clasificados dentro del tipo 1 de la enfermedad.

En 1924 Lieb comprobó que el material acumulado eran esfingoglucolípidos, identificándolo erróneamente como galactocerebrosido (6). Una década después Aghion demostró que el material acumulado era realmente glucocerebrosido (7).

En 1956, al conocerse que un componente importante del tejido cerebral y del cordón espinal era un galactocerebrosido (6), se creyó que probablemente la alteración de estas células era debida a una anomalía en el metabolismo de los carbohidratos, aspecto que se descartó al demostrarse que el test de tolerancia a la galactosa era normal. Igualmente estudiando cortes histológicos de tejido esplénico de pacientes afectados y comparándolos con los de sujetos normales marcando con glucosa-C14 o galactosa-C14, se demostró que los pacientes podían incorporar glucocerebrosido y galactocerebrosido, deduciéndose que por tanto el defecto no estaba en el proceso anabólico sino probablemente en el catabólico (8). En 1965 las investigaciones realizadas por el grupo de Brady consiguieron determinar por primera vez la actividad enzimática de β -glucocerebrosidasa (GC) en tejidos, demostrando ausencia de actividad de este enzima en los pacientes con EG (9).

- INTRODUCCIÓN -

Durante décadas el diagnóstico definitivo de EG se obtenía a partir de una muestra de médula ósea del paciente comprobando por microscopia óptica la presencia de células grandes y de aspecto espumoso, sin embargo este procedimiento tenía importantes problemas debido a la distribución no uniforme de las células de Gaucher en la médula ósea y la posibilidad de confundir esas células con las encontradas en otras enfermedades de acumulo lisosomal como la enfermedad de Niemann-Pick y otras enfermedades hematológicas o infecciones crónicas. Brady descubrió la existencia de actividad de GC en leucocitos y posteriormente Kampine demostró la actividad disminuida en leucocitos de pacientes con EG (10). La posterior modificación de la determinación de la actividad de GC en leucocitos usando un glucósido fluorogénico se ha generalizado como el “método oro” de diagnóstico de EG (11).

En 1983 Barneveld localiza el gen de la GC humana en el cromosoma 1 (12), siendo clonado por primera vez en 1984 por Ginns (13); conociéndose en la actualidad más de 200 mutaciones (14).

Tras la demostración del déficit enzimático en la enfermedad de Gaucher, la línea de investigación se centró en el desarrollo de un tratamiento efectivo. Brady (8) inició en los años 60 el camino hacia la terapia enzimática sustitutiva. Sin embargo fue un proceso dificultoso que requirió más de dos décadas para alcanzar un resultado satisfactorio. En la década de los 70 el grupo de investigadores dirigido por Brady descubrió que la placenta humana era uno de los tejidos más ricos en GC. En 1974 Brady demostró en dos pacientes esplenectomizados la reducción de glucocerebrosidos en plasma y tejido hepático tras infusión de un extracto purificado del enzima obtenido de placenta humana (15). Sin embargo los resultados en otros pacientes con mayor acumulo de glucocerebrosidos en hígado fueron contradictorios. En esas fechas se conocía que los glucocerebrosidos se originaban de las membranas de las células rojas y blancas y que el catabolismo de esos materiales tenía lugar en los macrófagos del hígado, bazo y médula ósea (16). El siguiente paso fue dirigir la GC a los macrófagos tisulares; conociéndose que los macrófagos tenían en su superficie lugares específicos de reacción para radicales de manosa (17) lo que hacía posible la hipótesis de que el aumento en la expresión de los mismos en la enzima exógena facilitaría su captación por los macrófagos. Esta hipótesis se confirmó pronto al demostrarse que la GC modificada mediante la escisión enzimática de los tres residuos externos de

- INTRODUCCIÓN -

carbohidrato que exponían radicales manosa era eficaz clínicamente (18-21). Los primeros ensayos clínicos con éxito se comunicaron a principios de la década de los 90 (22-25). En los últimos años se ha introducido un producto totalmente sintético que difiere de la enzima placentaria únicamente en un aminoácido lo que evita los riesgos potenciales de contaminación por impurezas hormonales del extracto placentario (26).

Sin embargo a pesar del indiscutible éxito del tratamiento enzimático sustitutivo (TES) en los pacientes con EG tipo I, su utilización en los pacientes con formas neurológicas sigue resultando problemático; convirtiéndose el tratamiento de estos pacientes en uno de los retos principales de los próximos años. Otra línea indiscutible de investigación será la consolidación de nuevas estrategias que faciliten la terapia génica, cuyas investigaciones se iniciaron en la última década existiendo estudios en los que se está demostrando su eficacia terapéutica en modelos animales (27); así como otras líneas de investigación que implican el desarrollo de la biotecnología aplicada al tratamiento de los errores metabólicos como la aplicación de pequeñas moléculas que inhiben la formación de sustrato y por lo tanto impiden el acúmulo del material glucolipídico, estrategia aplicable a la EG (28) y a otras enfermedades de acumulo.

El estudio de la enfermedad de Gaucher desde su primera descripción en un paciente en 1882 hasta el descubrimiento del defecto enzimático en 1965 ha llevado a la identificación de los déficits enzimáticos en otras enfermedades de acumulo lipídico en el hombre. Además el tratamiento enzimático sustitutivo que tan beneficioso se ha mostrado en los pacientes con EG se convierte en referencia en el tratamiento de muchas otras alteraciones metabólicas en el hombre.

Tabla 1. Momentos históricos más destacados en la EG.

1882	Primera descripción (Gaucher)
1927	Primera descripción formas neuronopáticas (Oberling)
1934	Acúmulo de glucocerebrósidos (Aghion)
1965	Ausencia de actividad de la GC (Brady)
1984	Clonación del gen de la GC (Ginns)
1991	TES con respuesta favorable (Barton)
2000	Tratamiento anti sustrato (Cox)

2- ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Los primeros intentos para determinar la prevalencia de la EG se basaban en la existencia de casos confirmados (detección de homocigotos) en la población de judíos Ashkenazi en Israel; de esta manera Fried estimó una incidencia de la enfermedad de 1:7750 y 1:10000 (29,30). Sin embargo debido a que un gran número de afectados de EG no demandan asistencia sanitaria como consecuencia del curso benigno de su enfermedad, incluso asintomático en alguno de ellos, las estimaciones hechas en base a casos diagnosticados serán menores que la incidencia real de la enfermedad. A pesar de que existe un conocido solapamiento en la actividad de β -glucocerebrosidasa entre individuos normales y heterocigotos, se han realizado estimaciones de la incidencia de la enfermedad a partir de estos datos; ofreciendo resultados muy divergentes que situaban la incidencia en 1:640 (31), 1:2003 (32) y 1:3969 (33). Por el contrario las estimaciones realizadas en base a screening de las mutaciones más prevalentes ofrece resultados más aproximados. El resultado combinado de dos estudios (34,35) que incluían 2121 judíos ashkenazi aparentemente sanos mostró que 124 eran heterocigotos para la mutación N370S y 6 homocigotos, lo que suponía una frecuencia génica de 0.0231. Diez individuos eran heterocigotos para la mutación 84GG, dando lugar a una frecuencia génica de 0.00217. La frecuencia combinada en esta serie era de 0.0343; pudiéndose estimar una incidencia a partir de estos datos de 1.03/1000 recién nacidos para la mutación N370S en homocigosis y 0.14/1000 recién nacidos en heterocigosis para las citadas mutaciones. La incidencia combinada en esta población sería de 1 caso por cada 855 recién nacidos (29,36).

En otras poblaciones existen menos referencias de la prevalencia de EG, y en general corresponden a estudios de prevalencia de enfermedades lisosomales en base a casos confirmados con diagnóstico enzimático. En 1999 se comunicó (37) la prevalencia de enfermedades lisosomales en Holanda; siendo la prevalencia combinada al nacimiento para este grupo de enfermedades de 14/100000 nacimientos vivos. Un dato llamativo en este estudio era que la EG era superada en prevalencia en contra de lo que cabría esperar por la glucogenosis tipo II (2/100000 nacimientos vivos) y la leucodistrofia metacromática (1.42/100000 nacimientos vivos). En esta población la prevalencia al nacimiento para la EG era de 1.16/100.000. Probablemente este hecho se deba como ocurre en otras poblaciones a la falta de diagnóstico de aquellos individuos con formas más benignas. En el mismo año se presentó la prevalencia de enfermedades lisosomales

- INTRODUCCIÓN -

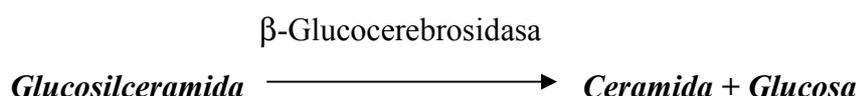
en Australia (38); siendo esta de 1 caso por cada 7700 nacidos vivos. En esta ocasión la EG era la más prevalente entre las enfermedades lisosomales (1 caso por cada 57000 nacidos vivos). Sin embargo en población no ashkenazi no existen estimaciones de prevalencia en base a screening de las mutaciones prevalente. En este sentido únicamente existe un estudio realizado en Portugal (39), determinando la prevalencia de N370S en 2000 muestras de sangre de cordón, mostrando una frecuencia para esta mutación de 0.0043 (unas 5 veces menor que la comunicada en población ashkenazi).

Todos estos datos hacen referencia fundamentalmente a la EG tipo I; la prevalencia de las formas neuropáticas es sensiblemente menor; en el caso de la EG tipo 2 se ha estimado frecuencias de menos de 1/100000 nacidos vivos y esto es probablemente debido a la gran incidencia de abortos que ocasiona esta forma de presentación, así como la poca viabilidad de los recién nacidos que presentan una alta incidencia de complicaciones postparto (31).

En la población general se ha estimado una frecuencia de EG tipo 3 que varía entre 1/50.000 y 1/100000 nacidos vivos (40). El prototipo de esta enfermedad es la forma Norrbottnian, que es el nombre de una comunidad sueca donde se da particularmente esta forma de presentación, aunque es de distribución panétnica.

3. ASPECTOS ENZIMÁTICOS Y GENÉTICOS

La EG es un trastorno congénito del metabolismo de herencia autosómica recesiva, causado por un defecto en la biogénesis de la hidrolasa lisosomal GC (β -glucosidasa ácida) (41). La ausencia o muy baja actividad de este enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces β -glucosídicos de los glucolípidos provoca la acumulación lisosomal del glucocerebrosido (o glucosilceramida), lípido extremadamente insoluble que es normalmente catabolizado por el enzima glucocerebrosidasa en la siguiente reacción:



3.1 La sustancia acumulada y patogénesis de la enfermedad

El sustrato natural más importante para la β -glucosidasa ácida es el N-acil-esfingosil-1-O-D-glucosido (40). Este sustrato ha sido también denominado como glucosilceramida (Figura 1), ceramida β -glucósido o glucocerebrosido; y el enzima también denominado como glucocerebrosidasa, glucosilceramidasa, ceramida β -glucosidasa o β -glucosidasa ácida. Con alguna variación en la longitud de la cadena, la molécula esfingosil es (2S, 3R, 4E)-2-amino-4-octadeceno-1,3-diol (42,43). El ácido graso puede variar entre 16 y 24 carbonos en su longitud (44,45). La glucosilceramida está ampliamente distribuida en muchos tejidos de mamíferos en pequeñas cantidades como metabolito intermediario en la síntesis y degradación de glucoesfingolípidos complejos, como los gangliósidos y globósidos (Figura 2). De forma habitual su localización está en las membranas celulares.

Otro sustrato del enzima, aunque menos importante desde un punto de vista patológico, es glucosilesfingosina. Esta molécula deriva de la condensación de esfingosina y β -glucopiranosido (40).

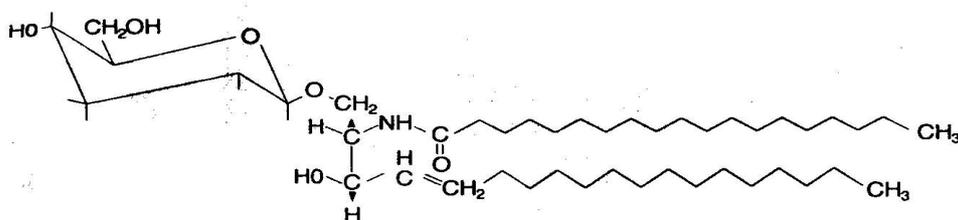


Figura 1. Glucosilceramida.

La glucosilceramida es sintetizada a partir de la ceramida y UDP-glucosa por la enzima glucosilceramida sintetasa (46,47,48,49). La reacción tiene un pH óptimo en 7.8 y valores de K_m de 0.12 y 0.8 mM para la ceramida y UDP-glucosa, respectivamente (46,47). Este proceso está presente en el cerebro y en una gran variedad de tejidos y células (50,51). Aunque tanto la esfingosina como la ceramida son sintetizadas en el retículo endoplásmico, la síntesis de la glucosilceramida tiene lugar en el complejo cis-Golgi (52). La mayor parte de la región activa de la enzima se localiza en la región citoplásmica del complejo cis-Golgi (48,49). La glucosilceramida es el único

- INTRODUCCIÓN -

glucoesfingolípido sintetizado con la cabeza polar en la superficie citoplásmica del complejo de Golgi. En la actualidad, el tratamiento oral (OGT 918) en la EG trata de bloquear la síntesis del sustrato (28,53).

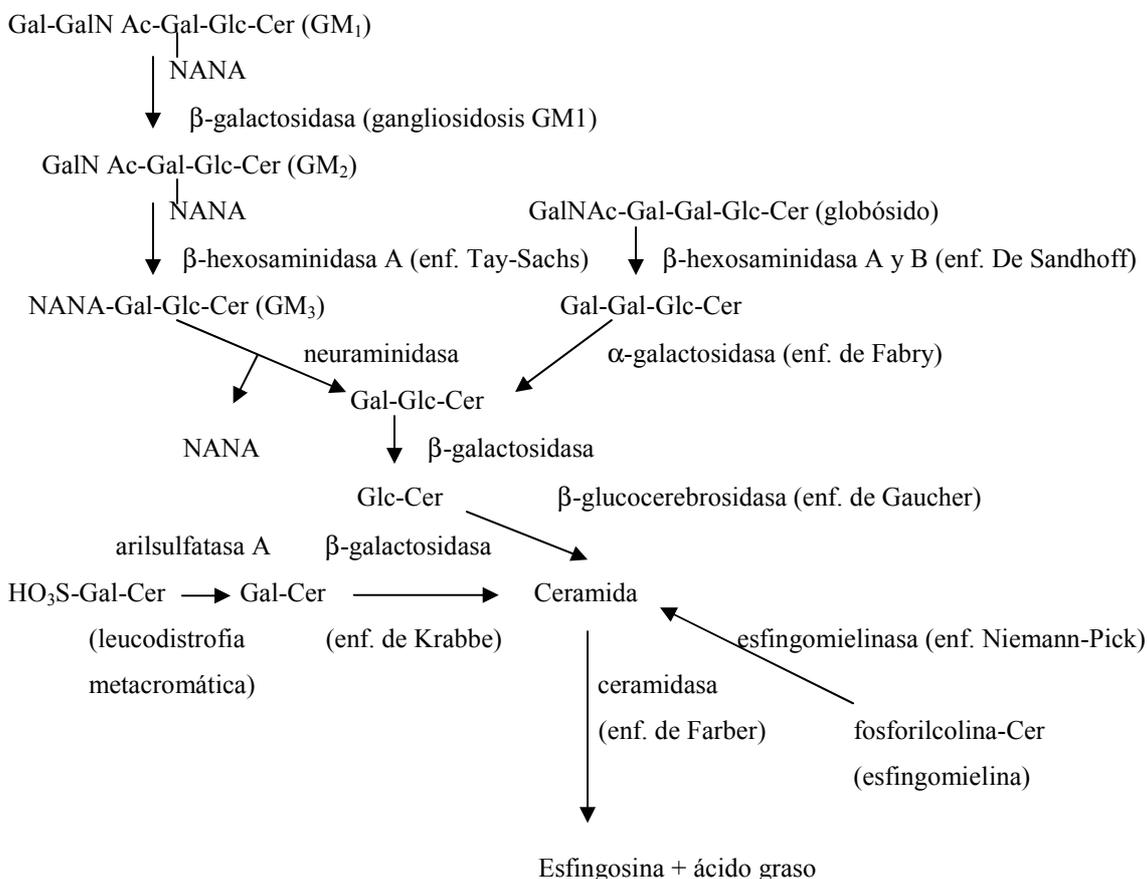


Figura 2. Ruta de degradación de glucoesfingolípidos complejos.

La glucosilceramida es el penúltimo metabolito intermediario en la ruta de degradación de muchos complejos glucoesfingolípidos. Tras la acción de la enzima β-glucosidasa ácida se forma ceramida, el último metabolito, a su vez degradado por la ceramidasa ácida en esfingosina y ácido graso (54).

Los macrófagos son el destino final de los glucocerebrosidos no catabolizados cuando existe una actividad deficitaria de la glucocerebrosidasa. Los macrófagos que provienen de las células hematopoyéticas y de los monocitos circulantes son muy numerosos en el hígado, bazo, hueso y pulmón, órganos que pueden estar en mayor o menor grado afectados en la EG. El origen de las glucosilceramidas almacenadas en las células denominadas de Gaucher tiene implicaciones importantes en la fisiopatología e

- INTRODUCCIÓN -

intervenciones terapéuticas de la enfermedad, existiendo evidencias que indican que la fagocitosis de elementos de la sangre son la fuente primaria de los lípidos intracelulares acumulados en las vísceras. Se ha descrito la presencia de fragmentos de eritrocitos en células de Gaucher del bazo, lo que sugiere que las membranas de los eritrocitos y de los leucocitos pudieran ser una fuente de los glucolípidos almacenados intracelularmente (55, 56).

Los niveles plasmáticos de glucosilceramida están elevados de 2 a 20 veces en los pacientes afectos, pero estos niveles no se correlacionan ni con el tipo ni con la expresión clínica dentro del mismo tipo de la enfermedad (57,58). Los análisis de lípidos en hígado, bazo o cerebro han permitido el aislamiento y la caracterización estructural de los esfingolípidos acumulados y han revelado que los tejidos también presentan un elevado contenido de glucosilceramida con incrementos entre 20 y 200 veces superiores a lo normal (45). La distribución, la cantidad y el tipo de lípido acumulado en los tejidos afectados varía con las formas clínicas e incluso con las variantes de la enfermedad. Son fundamentalmente el hígado, bazo y cerebro los órganos donde se han realizado análisis exhaustivos de su contenido lipídico. Es en hígado y bazo donde se han encontrado los mayores aumentos en glucosilceramidas (45, 58, 59, 60).

Las células de Gaucher y el acúmulo de glucosilceramida en la enfermedad tipo 1 se localiza en las áreas periadventiciales vasculares de los espacios de Virchow-Robin. La composición de ácidos grasos y de esfingosina de los lípidos acumulados en el cerebro de pacientes con enfermedad tipo 1 estaba en relación con el origen visceral de dichos lípidos (45). Por el contrario el análisis de glucosilceramidas procedentes de cerebros de pacientes no esplenectomizados con enfermedad tipo 2 y 3 demostraban su origen neural (45,59). En estos pacientes se comprobó que los niveles de glucosilesfingosina acumulada eran mayores que los encontrados en el cerebro de pacientes con la forma tipo 1 (45). En pacientes esplenectomizados con enfermedad tipo 3, se encontraron concentraciones mayores de glucosilceramida en el hígado y cerebro en relación a individuos no esplenectomizados con la misma variante de la enfermedad (61).

La fibrosis en los tejidos de las vísceras y gliosis en el cerebro está considerada el signo patológico más precoz y común de la EG, aunque la capacidad regenerativa tisular

puede ocultar que probablemente sea la muerte celular el primer evento patogénico de la enfermedad, ya que en el cerebro de los pacientes con el tipo neuronopático, la pérdida de neuronas es el hallazgo patológico más importante (55).

El mecanismo por el que los glucolípidos acumulados intracelularmente conducen al desarrollo de la EG no está claro. Algunos estudios sugieren que los glucolípidos son sustancias citotóxicas que tendrían un papel patogénico importante en el desarrollo de las esfingolipidosis (62). Sin embargo, el progreso de la enfermedad hacia diferentes fenotipos, aunque esté producida por la misma mutación, indica que además del esfingolípido almacenado pueden estar implicados otros factores adicionales. En la última década se ha relacionado la implicación de los esfingolípidos en la fibrosis tisular con efectos tóxicos directos de la glucosilceramida y con la síntesis o degradación anormal del colágeno (63). La fibrosis podría acelerarse por un fenómeno de protección del organismo frente a las células de Gaucher a las que consideraría extrañas (64).

Diversos estudios han sugerido que los glucoesfingolípidos no degradados pueden estimular la producción de citoquinas e inducir procesos inmunológicos que pueden tener efectos patogénicos en estadios muy tempranos de la enfermedad antes de producirse el depósito masivo del glucocerebrosido. Posibles efectos de activación del sistema inmune por la glucosilceramida se desprenden de un trabajo de Michelakakis (65), en que se sugiere una respuesta inflamatoria en un grupo de pacientes afectos con la EG que presentan niveles elevados de las citoquinas proinflamatorias interleuquina-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

3.2 La β -glucosidasa ácida

Un gran número de investigadores han sugerido diversos tipos de glucocerebrosidasa mutada en la EG, basados en las diferentes respuestas experimentadas por la actividad (66,67), procesamiento y estabilidad (68,69) de dicha enzima ante distintos modificadores. De esta manera se han propuesto dos tipos de enzimas residuales: 1) aquellas con descenso de la estabilidad, que interaccionan de un modo normal con los inhibidores y presentan un descenso de las constantes del rango catalítico (generalmente encontradas en enfermos de Gaucher de origen no judío) y, 2) aquellas con una estabilidad normal, un descenso de la afinidad del centro activo (Figura 3) de la enzima por los inhibidores y un moderado descenso de las constantes catalíticas (generalmente

- INTRODUCCIÓN -

encontradas en pacientes de origen judío). Debido a que muchos pacientes, particularmente aquellos de origen no judío, presentan dos mutaciones diferentes en los alelos de la β -glucosidasa ácida, es necesaria una expresión heteróloga de los c-DNAs mutados para correlacionar las propiedades de la enzima celular con cada mutación particular y, después de numerosos estudios se ha visto que la mayor parte de estas mutaciones dan lugar a enzimas inestables (70). Otras muchas mutaciones de cambio de aminoácidos, identificadas en pacientes con EG, dan lugar a enzimas con actividad catalítica reducida (70, 71, 72). Como ejemplo del primer tipo de mutaciones, con actividad residual baja, estaría la mutación L444; y como ejemplo del segundo tipo de mutaciones estaría la mutación común N370S.

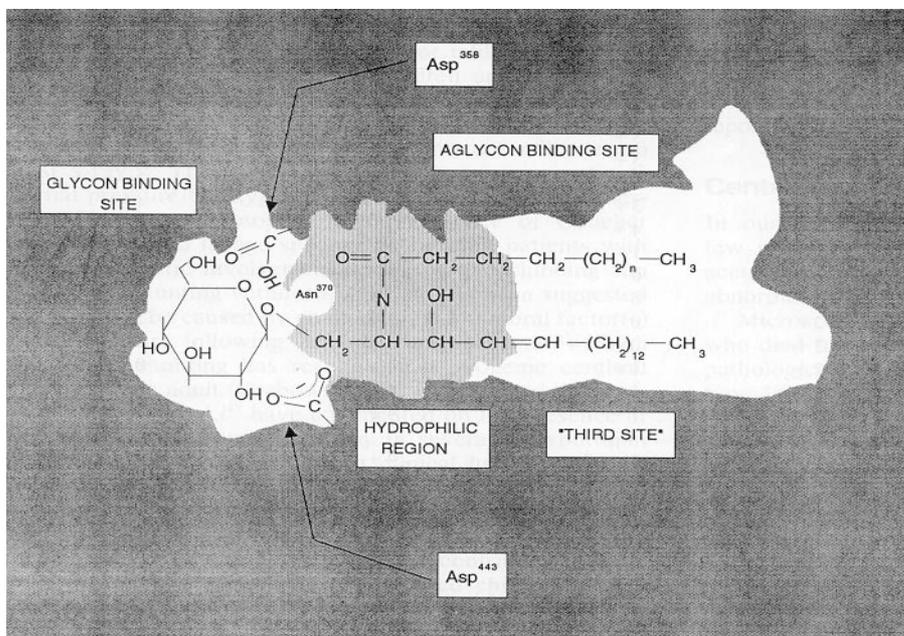


Figura 3. Sitio activo de la β -glucosidasa ácida.

3.2.1 Características generales de la β -glucosidasa ácida

La β -glucosidasa ácida es una proteína compacta de la membrana lisosomal (73) que ha sido purificada en los tejidos de numerosas especies, aunque la mayor parte de los estudios han sido realizados en humanos (74). La enzima humana es una glicoproteína homomérica, y la secuencia completa del c-DNA fue descrita por Tsuji en 1986 (75). La proteína humana madura contiene 497 aminoácidos con un peso molecular calculado de 56 kDa. La forma glicosilada derivada de la placenta tiene un peso molecular aproximado de 65 kDa.

- INTRODUCCIÓN -

Alrededor del 13% de los residuos de la enzima son básicos (lisina, arginina o histidina) y el punto isoeléctrico calculado (pI) es 7.2. Esto último es consistente con los valores determinados experimentalmente (pI = 7.3-7.8) en las preparaciones placentarias que contienen únicamente el oligosacárido neutral manosa (76). La proteína contiene alrededor de un 11% de residuos leucina y un 45% de aminoácidos no polares. Estudios de digestión proteolítica de la β -glucosidasa ácida, obtenidos "in vivo" por translación en el interior de membranas microsomales, indican la ausencia de la enzima en el citoplasma celular (77).

Las secuencias de la β -glucosidasa ácida humana presenta cinco posiciones para la N-glicosilación. Estudios de digestión en fibroblastos humanos que contienen β -glucosidasa ácida han demostrado que únicamente son utilizados cuatro de los sitios potenciales de glicosilación (77). La expresión del c-DNA en células procariotas indica que esta glicosilación es esencial para el desarrollo de la actividad catalítica de la enzima (78), pero no es necesaria para mantener la actividad en las células (79). Utilizando técnicas de mutagénesis dirigida se ha comprobado que únicamente se precisa la primera glicosilación para desarrollar una enzima activa (80).

3.2.2 Propiedades cinéticas

Los estudios de la cinética enzimática de la β -glucosidasa ácida son altamente complicados debido a su asociación con la membrana y la necesidad de utilizar detergentes, así como técnicas de deslipidación para su solubilización y para la reconstrucción de la actividad enzimática. El acúmulo de la glucosilceramida en los tejidos de los pacientes afectados por la EG indican que éstos son los substratos naturales para la β -glucosidasa ácida. Las glucosilceramidas son insolubles en medio acuoso y requieren un ambiente lipoidal para la solubilización. Un substrato sintético, el 4-metilumbeliferilglucopiranosido (4-MU-Glc), posee una aceptable solubilidad en medio acuoso aunque parcialmente limitada. Debido a esto, los ensayos enzimáticos para la β -glucosidasa ácida son realizados en soluciones heterogéneas cuyos componentes físicos y fases de estado influyen en la actividad enzimática, presentando interacciones con determinadas moléculas. A pesar de todo se mantienen una relativa consistencia de los resultados de los ensayos enzimáticos que se realizan en los laboratorios de referencia, los cuales emplean o bien una mezcla micelar con combinaciones de éteres de

polioxietileno (ej. Triton X-100), sales biliares (ej. Taurocolato sódico) (81,82) y/o ácidos grasos (ej. Ácido oleico) o fosfolípidos o glucoesfingolípidos cargados negativamente solubilizados por medio de sonicación. En ausencia de detergentes o lípidos cargados negativamente, la β -glucosidasa ácida deslipidada humana presenta muy poca actividad proteolítica. En suma, los valores cinéticos (K_m y V_{max}) obtenidos en ausencia de las sustancias anteriores no pueden ser interpretados debido al estado de agregación del enzima y los substratos de glucosilceramida (83).

3.2.3 Efectos de los fosfolípidos y glucoesfingolípidos cargados negativamente

Debido a la rápida pérdida de actividad en la purificación de la β -glucosidasa ácida y su asociación in vivo a la membrana, son necesarios lípidos específicos derivados de la membrana para la actividad de la misma. Dale (83) encontró un aumento de la actividad de la β -glucosidasa ácida al ponerla en contacto con el 4-MU-Glc en presencia de fosfolípidos cargados negativamente según el presente orden: fosfatidilserina > fosfatidilinositol > ácido fosfatídico. La fosfatidiletanolamina o la colina no tienen efecto sobre la misma. Estos resultados han sido reproducidos con posterioridad por muchos otros autores tanto en experimentos humanos como en bovinos y murinos (82,84). Utilizando sistemas de membrana artificial como liposomas, para lograr la actividad óptima del enzima también se requieren fosfolípidos cargados negativamente que deben unirse a la β -glucosidasa ácida (85). Sarmientos encontró la máxima actividad enzimática con un 19% de moléculas de fosfatidilserina en liposomas, en el mismo orden y magnitud en que se encuentran en las membranas lisosomales (83). Glew ha establecido una relación entre la estructura de los fosfolípidos o glucoesfingolípidos cargados negativamente y la actividad de la β -glucosidasa ácida (86,87). La caracterización de los lípidos asociados a la β -glucosidasa ácida en los diferentes tejidos está siendo objeto de estudio debido al gran interés que despierta “in vivo” el ambiente funcional hidrofóbico existente.

3.2.4 Activación por saposinas

Las saposinas A y C activan la β -glucosidasa ácida in vitro en presencia de fosfolípidos cargados negativamente. Si bien la saposina C activa la esfingomielinasa y la degradación de galacosilceramida a través de la β -galactosidasa, el acúmulo de dichos substratos para las enzimas mencionadas no han sido descritas en los pacientes con

deficiencia de saposina C y afecto de EG (88). No se han descrito en la actualidad pacientes con deficiencia de saposina A. La interacción de la saposina C con la β -glucosidasa ácida ha sido estudiada por numerosos autores (84,89). La saposina C interactúa directamente con la enzima (90) pero no lo hace con la glucosilceramida tanto en condiciones de equilibrio como de desequilibrio (91). Las sales biliares o los detergentes de polioxietileno interfieren con los efectos de activación ejercidos por la saposina C (90,91), así como las elevadas concentraciones de fosfolípidos cargados negativamente (91). Los resultados de los experimentos de Berent y Radin (91) sugieren que, a bajas concentraciones, la fosfatidilserina interactúa con un punto aniónico de la enzima, pero a elevadas concentraciones compite por el sitio de la saposina C dando lugar a un descenso en los efectos de activación enzimática; sin embargo, los efectos activadores de la saposina C precisan la presencia de fosfolípidos o glucoesfingolípidos cargados negativamente (89-91). Se cree que estos efectos son mediados por cambios conformacionales en la β -glucosidasa ácida, de tal manera que la interacción con la fosfatidilserina origina un cambio en la forma de la enzima para la interacción con la saposina C (91). Por medio de la utilización de anticuerpos monoclonales se ha podido demostrar que la saposina C da lugar a un cambio en conformación de la β -glucosidasa ácida que aumenta la actividad catalítica (92), sin embargo todavía queda mucho por conocer en lo que concierne al papel que juegan “in vivo” las saposinas A, C y D.

3.2.5 Propiedades del centro activo del enzima

Los substratos naturales para la β -glucosidasa ácida son mezclas de N-acil-esfingosil-1-0- β -D-glucósidos, glucosilceramidas, con diferentes acil ácidos grasos y esfingosina en función del tipo de tejido (60,93). El 4-MU-Glc es también un excelente substrato para estimar la actividad de la β -glucosidasa ácida. La K_m aparente para el 4-MU-Glc está alrededor de 1.5-4 mM, aproximadamente 100 veces mayor que para las glucosilceramidas (20-50 μ M). La enzima tiene un pH óptimo de 5.5, el cual varía ligeramente en función de la composición de la mezcla utilizada para el ensayo enzimático. Un pH óptimo más ácido (aproximadamente 4.5) se obtiene en los medios fosfolípido / saposina C. Se sabe que el sitio activo de la enzima es específico para la D-glucosa, y los L-glucosil derivados de la glucosilceramida no son hidrolizados (94), y los D-glucosil-D-eritroceramidas son mejores substratos que los derivados D-glucosil-L-eritroceramidas (95). Los rangos obtenidos in vitro para la metabolización de las

- INTRODUCCIÓN -

glucosilceramidas contienen cadenas de ácidos grasos entre los 8 y los 18 átomos de carbono (96).

Graboswski ha realizado numerosos experimentos sobre la especificidad del sustrato y la inhibición de la enzima, proponiendo un modelo cinético del sitio activo de la β -glucosidasa ácida que incluye tres puntos posibles para la unión al grupo glucídico, la mitad esfingosil y la cadena de acil ácidos grasos de la glucosilceramida. La interacción con el grupo glucídico requiere un grupo hidroxilo a nivel de la glucosa (97), mientras que se cree que los grupos esfingosil y acil ácido graso se posicionan con las cadenas hidrofóbicas hacia arriba con la cadena de 16 átomos de carbono en extensión. Este modelo es el mismo que se ha propuesto para la unión de la globotriacilceramida a la saposina B (98) y de los fosfolípidos a su proteína transportadora (99). Si bien se precisan datos estructurales adicionales para estos modelos, estos sirven como prototipos para los sitios de unión de las proteínas transportadoras de lípidos y para la unión a los sitios activos de las hidrolasas de glucoesfingolípidos.

El conuritol β epóxido (CBE), 1-D-1, 2-anhidro-mio-inositol, es un derivado de inhibidores directos de muchas β -glucosidasas y se une covalentemente al centro activo de la enzima por medio de la formación de un enlace éster (100). Derivados radioactivos del CBE han sido utilizados para identificar los residuos de aminoácidos que constituyen el centro activo de muchas β -glucosidasas. En la enzima humana el centro activo está a nivel del aminoácido en posición 443 (101). A partir de datos obtenidos con el CBE acerca de los mecanismos de otras β -glucosidasas, el mecanismo catalítico de la enzima humana incluye la unión β -glucosídica, la liberación de la ceramida, la donación de agua al complejo formado por la glucosa y la enzima, y la obtención de la β -glucosa (102). La expresión de enzimas mutadas han proporcionado abundantes datos acerca de la localización de regiones catalíticas que pueden contribuir a la acción catalítica. Estos estudios y la homología de la enzima humana con la murina han permitido encontrar residuos que influyen en la catálisis y posiblemente en la unión de la saposina C con el grupo carboxilo terminal de la proteína (80, 102, 103).

3.2.6 Proceso postranslacional de la β -glucosidasa ácida

Se ha investigado la biosíntesis de la β -glucosidasa ácida normal en cultivos de células procedentes del riñón de cerdos y fibroblastos humanos (77,104). Tales estudios han permitido conocer el origen de las tres formas moleculares de la β -glucosidasa ácida observadas en los fibroblastos de la piel en humanos y extractos cerebrales (105). Se conoce en la actualidad que la deglicosilación total de la β -glucosidasa ácida en los fibroblastos humanos origina una forma inmunorreactiva simple de 56 kDa (106). Estos hallazgos indican que se produce una glicosilación diferencial postranslacional dando lugar a diferentes estados de la enzima. Los estudios metabólicos demuestran que la primera forma detectable de enzima en los humanos contiene gran cantidad de cadenas manosa (77,104). Entre 1 y 24 horas más tarde, estas formas iniciales son transformadas cuantitativamente a una forma de mayor peso molecular que no responde completamente al tratamiento con endoglucosidasa H (77,104). Posteriormente, esta forma de alto peso molecular es convertida en unas 72 horas a una forma glicosilada con 59 kDa. El proceso final de maduración de la proteína tiene lugar coincidiendo con el transporte de la cadena polipeptídica, mientras cruza el retículo endoplásmico (107). A diferencia de otras hidrolasas lisosomales, no tienen lugar modificaciones proteolíticas (108). El tiempo de transporte de la β -glucosidasa ácida por el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi se calcula que es de unas tres horas, lo cual es elevado al compararlo con otras enzimas lisosomales (109), y la vida media intracelular es alrededor de 60 horas; relativamente corta (104). Las enzimas son introducidas dentro de los lisosomas por una señal manosa-6-P y desde aquí pasan a la membrana celular. A pesar de que la β -glucosidasa ácida se regula bajo estas directrices generales, parece que otras señales además de la manosa 6-P son responsables del almacenamiento lisosomal.

3.2.7 Saposinas A y C

Desde hace años se conoce que en la hidrólisis de la glucosilceramida in vivo interviene otro componente, la saposina C (sap-C o SAP-2; sphingolipid activator protein) (110,111,112). Mientras un gran número de pacientes con EG acumulan glucosilceramida debido a mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa, solamente dos pacientes hasta la fecha que mostraban un fenotipo compatible con EG y acúmulo de glucosilceramida a pesar de unos niveles enzimáticos normales, han sido comunicados.

- INTRODUCCIÓN -

Uno de los pacientes de origen suizo (88) y el segundo de origen español (113). Ambos presentaban una deficiencia de saposina C probada inmunológicamente y confirmada tras análisis de la mutación (114,115).

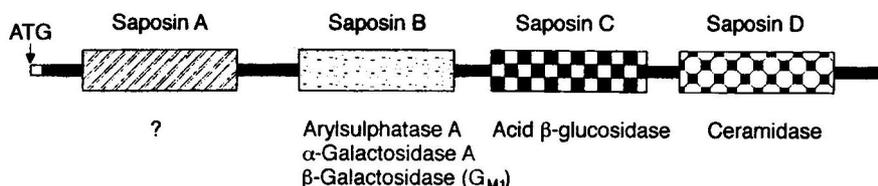


Figura 4. Gen de la prosaposina.

El gen responsable de la síntesis de esta proteína, situado en el cromosoma 10 (116,117) codifica una proteína precursora, prosaposina (Figura 4), que posteriormente da lugar a cuatro proteínas homólogas que se designan como saposinas A, B, C y D (118). sap-B y sap-C se corresponden con las antiguamente denominadas SAP-1 y SAP-2, respectivamente. Sólo se conoce un caso de déficit múltiple de las cuatro saposinas como consecuencia de una mutación homocigota que afectaba el codón de inicio del mRNA de la prosaposina (119). Si la saposina C incrementa la actividad in vitro de la β-glucosidasa ácida, se sabe que la saposina B ejerce la misma función con la arilsulfatasa A, α-galactosidasa A y β-galactosidasa (G_{M1}) y la saposina D estimula la degradación lisosomal de la ceramida por acción de la ceramidasa ácida (120, 121). Se desconoce la función de la saposina A.

La saposina humana C tiene un peso molecular de 8.9 kDa y 80 aminoácidos, siendo una glucoproteína ácida (pI=4,2); esto es debido a la presencia de un 20% de aminoácidos ácidos (Asp y Glu) (122). Posee una secuencia para la N-glicosilación, a diferencia de la A que posee dos (118).

Desde un punto de vista clínico los dos casos comunicados con déficit de sap-C se ha presentado como formas neuronopáticas de la enfermedad (123). Concretamente el caso español inició su sintomatología a los 8 años de edad, presentando inicialmente episodios de pérdida de conciencia, mioclonias y convulsiones generalizadas rebeldes a los tratamiento antiepilépticos. Posteriormente desarrolló una oftalmoplejia horizontal progresiva, afectación piramidal y cerebelosa, falleciendo a los 15 años de edad. Desde

un punto de vista neuropatológico se comprobó la existencia de pérdida neuronal, acúmulo masivo lipídico intraneuronal y ausencia de células de Gaucher a nivel perivascular. La concentración de glucosilceramida en el cortex en diferentes regiones anatómicas se encontraba aumentada (123).

3.3 Bases moleculares de la enfermedad de Gaucher

3.3.1 Organización genómica

El gen de la GC se sitúa a nivel del cromosoma 1, en la región q21. Tiene un tamaño de 7.5 kilobases (Kb) y contiene 11 exones y 10 intrones. La secuencia completa del gen se conoce desde 1989 (124). A 16 kilobases del extremo 3' se sitúa una estructura de 5.8 Kb (124, 125) que se corresponde con el pseudogen, que tiene una homología del 96% con el gen estructural. El pseudogen difiere del gen estructural en cuanto a tamaño debido a que posee varias deleciones que corresponden a secuencias de elementos Alu (secuencia repetitiva constituida por unos 300 pares de bases (pb) que poseen un sitio de reconocimiento para la restrictasa Alu I) (126) del gen estructural situados en los intrones 2 (312 pb), 4 (626 pb), 6 (320 pb) y 7 (277 pb), así como dos deleciones más pequeñas situadas a nivel de los exones 9 (55 pb) y 4 (5 pb) (124). Además el pseudogen posee múltiples mutaciones puntuales localizadas tanto en los exones como en los intrones correspondientes del gen estructural (124). La existencia de este pseudogen va a facilitar el intercambio de fragmentos de DNA entre el gen estructural y el pseudogen durante el proceso de recombinación, dando lugar a alelos no funcionantes denominados alelos de recombinación (Rec) (125,127,128). Desde que se conoce que las secuencias Alu son elementos móviles (126, 129) que pueden insertarse en el DNA, se interpreta que el pseudogen representa un gen ancestral de la β -glucosidasa ácida con la secuencia original modificada por la inserción de estos elementos. El mecanismo propuesto para la inserción de estas secuencias Alu (130) es la duplicación de copias simples que forman repeticiones que flanquean dichas secuencias Alu.

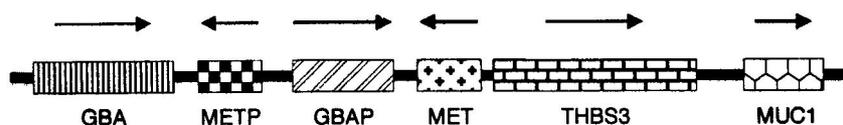


Figura 5. Organización genómica en el cromosoma 1.

- INTRODUCCIÓN -

Inmediatamente después del gen de la GC (Figura 5), se ha descubierto recientemente el gen de la metaxina (MTX), de función todavía desconocida (131). Este gen es contiguo al de la trombospondina 3 y al pseudogen de la GC, aunque el gen de la MTX se transcribe en dirección puesta al de la trombospondina 3, y ambos genes comparten una región promotora común (132). La proximidad de estos genes con el gen de la GC puede tener importantes implicaciones patológicas, ya que es posible que se puedan producir grandes deleciones en esa zona afectando, a varios genes, dando lugar a expresiones fenotípicas complejas (133).

Por otra parte, a una distancia de unas 100 Kb se encuentra situado el gen de la piruvato kinasa de las células rojas hepáticas (liver red cell) (PKLR) (134), de tal manera que se ha comprobado que los sitios polimórficos de este gen están en fuerte desequilibrio de unión con los del gen de la GC. Este hecho, junto con la localización reciente de seis marcadores cercanos al gen de la GC (135), permite disponer de marcadores de gran utilidad para estudios de ligamiento genético.

3.3.2 Transcripción del gen de la GC

El promotor del gen estructural de la GC (Figura 6) tiene dos posibles secuencias consenso TATA, aunque se ha demostrado que solamente una de ellas desempeña la función de caja TATA. No se ha identificado ningún sitio de unión del factor de transcripción Sp1 (cajas GC cuya secuencia consenso es GGCGGG o su complementaria). Los promotores que contienen cajas TATA y CAAT se encuentran por regla general en genes altamente regulados (124). Estudios *in vitro* en los que se ha evaluado la potencia del promotor del gen estructural y del hipotético promotor del pseudogen indican que la secuencia del promotor del gen estructural es ocho veces más potente que la del pseudogen (124). Sin embargo se ha demostrado que a pesar del débil promotor del pseudogen se produce una cierta transcripción del mismo (136).

El RNAm del gen de la GC tiene una longitud de 2.5 Kb y comprende unas 250 pb de la zona 5' del gen y 550 pb de la región 3' no traducida, así como una cola de poli A de 100 pb. El gen de la GC se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos y los factores nucleares que se unen a secuencias consenso OCTA, AP-1, PEA3 y CAAT participan en la regulación de la expresión del gen de la GC (137). El nivel de expresión del RNAm puede estar aumentado 2 ó 3 veces en fibroblastos en cultivo y líneas

- INTRODUCCIÓN -

linfoides procedentes de pacientes con EG. Los estudios llevados a cabo con el promotor de la GC demuestran que el nivel de expresión celular de la GC depende de la concentración intracelular de la proteína, lo que implica, además, una regulación retrospectiva “feedback” de la expresión de la GC.

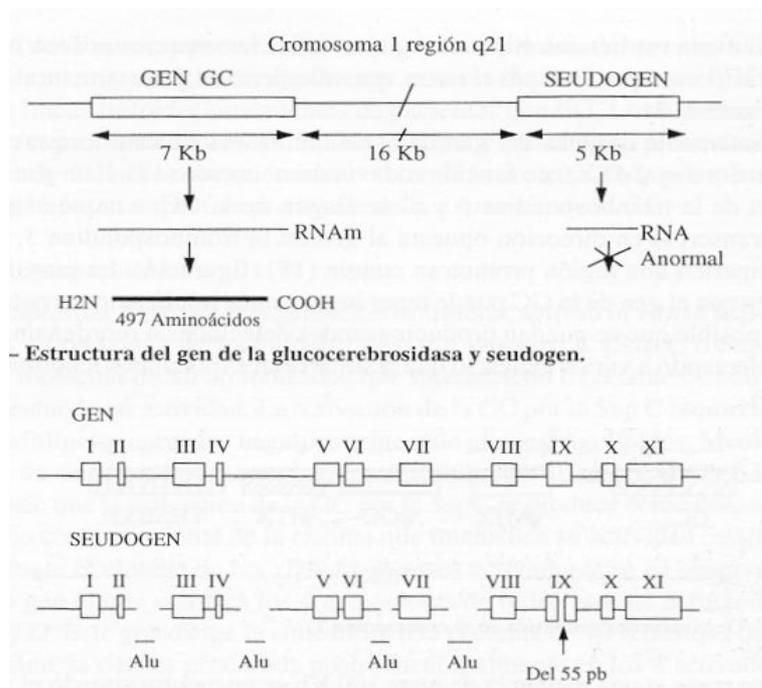


Figura 6. Estructura del gen y pseudogen de la glucocerebrosidasa

3.3.3 Mutaciones del gen de la GC

A finales de 1998 se conocían más de 120 mutaciones en el gen de la GC (138), ese número aumenta incesantemente y en la IV Reunión de Grupo Europeo de EG celebrada en Jerusalem en septiembre de 2000 se han descrito ya 200 mutaciones (14).

Las mutaciones se pueden clasificar en dos tipos desde el punto de vista genético: las que son consecuencia de un evento de recombinación entre el gen y el pseudogen, y las que no son consecuencia de esta recombinación (138). En este segundo grupo la mayoría de las mutaciones son consecuencia de cambios mínimos: transiciones, transversiones, delecciones o inserciones de un solo nucleótido.

Cuando la mutación es una delección, una inserción, un cambio de un codón de aminoácido por un codón de parada, o una mutación que afecta al ajuste (splicing), no

- INTRODUCCIÓN -

dará lugar a producto génico; es decir, no se observará proteína, denominándose a estos alelos “alelos nulos”. En otros casos como la mutación L444P sólo se produce una sustitución de un aminoácido por otro siendo la proteína mutada más inestable que la normal. En otros casos la mutación puede dar lugar a una sustitución de un aminoácido por otro que da lugar a una activación anormal por parte de la Sap C o por fosfolípidos, como es el caso de la mutación N370S. La actividad de todas las proteínas mutantes se encuentra reducida, aunque en algunas está más disminuida que en otras (70,139). Por ejemplo, la mutación P415R da lugar a una proteína de menor actividad que la mutación V394L (70).

Desde un punto de vista estrictamente molecular las mutaciones puntuales que se han encontrado en el gen de la GC se pueden clasificar en: mutaciones de sustitución de un aminoácido por otro “missense” (Tabla 2), mutaciones de codón de parada “nonsense” (Tabla 3), mutaciones que afectan al proceso de ajuste del RNA “splicing”, mutaciones que cambian la pauta de lectura como consecuencia de pequeñas deleciones o inserciones en la secuencia codificante “frameshift” (Tabla 4), y deleciones o inserciones que afectan a un fragmento largo del gen (138). Por último se encuentran las recombinaciones entre el gen y pseudogen (Tabla 5).

Además de estas mutaciones existen otras que son frecuentes en la población denominadas polimorfismos, que se producen en los intrones o zonas flanqueantes del gen del GC y que no afectan a la funcionalidad del gen (140). La combinación de la presencia o ausencia de estos sitios polimórficos, si fuese totalmente al azar daría lugar a 6144 haplotipos diferentes. Sin embargo, sólo se han observado 4 haplotipos diferentes, y 2 de ellos son los que aparecen con mayor frecuencia (140). A este desequilibrio existente de combinación al azar de estos sitios polimórficos se le denomina “desequilibrio de unión”.

- INTRODUCCIÓN -

MUTACIONES DESCRITAS EN LA EG

Tabla 2. Mutaciones que dan lugar al cambio de un aminoácido.

Alelo	cDNA	Exón	Sustitución nucleótido	Cambio aminoácido
V15L	160	3	G-T	Val-Leu
T43I	245	3	C-T	Thr-Ile
G46E	254	3	G-A	Gly-Glu
R48W	259	3	C-T	Arg-Trp
K79N	354	4	G-C	Lys-Asn
L105R	431	4	T-G	Leu-Arg
S107L	437	4	C-T	Ser-Leu
G113E	455	5	G-A	Gly-Glu
R120Y		5		Arg-Tyr
R120W	475	5	C-T	Arg-Trp
R120Q	476	5	G-A	Arg-Gln
P122S	481	5	C-T	Pro-Ser
T134P	517	5	A-C	Thr-Pro
D140H	534	5	G-C	Asp-His
K157Q	586	5	A-C	Lys-Gln
A176D	644	6	C-A	Ala-Asp
P178S	649	6	C-T	Pro-Ser
P182T	661	6	C-A	Pro-Thr
W184R	667	6	T-C	Trp-Arg
N188S	680	6	A-G	Asn-Ser
N188K	681	6	T-G	Asn-Lys
G189V	683	6	G-T	Gly-Val
V191G	689	6	T-G	Val-Gly
G195E	701	6	G-A	Gly-Glu
S196P	703	6	T-C	Ser-Pro
G202R	721	6	G-A	Gly-Arg
Y212H	751	6	T-C	Tyr-His
F213I	754	6	T-A	Phe-Ile
F216V	764	7	T-G	Phe-Val
F216Y	764	7	T-A	Phe-Tyr
T231I	809	7	C-T	Thr-Ile
S237F	827	7	C-T	Ser-Phe
S237P	827	7	T-C	Ser-Pro
H255Q	882	7	T-G	His-Gln
R257Q	887	7	G-A	Arg-Gln
P266R	914	7	C-G	Pro-Arg
R285C	970	7	C-T	Arg-Cys
P289L	983	7	C-T	Pro-Leu
Y304C	1028	8	A-G	Tyr-Cys
A309V	1043	8	C-T	Ala-Val
W312C	1053	8	G-T	Trp-Cys
Y313H	1054	8	T-C	Tyr-His

- INTRODUCCIÓN -

Alelo	cDNA	Exón	Sustitución nucleótido	Cambio aminoácido
D315H	1060	8	G-C	Asp-His
A318D	1070	8	C-A	Ala-Asp
T323I	1085	8	C-T	Thr-Ile
G325R	1090	8	G-A	Gly-Arg
E326K	1093	8	G-A	Glu-Lys
C342G	1141	8	T-G	Cys-Gly
V352L	1171	8	G-C	Val-Leu
R359Q	1193	8	G-A	Arg-Gln
S364N	1208	8	G-A	Ser-Asn
S364T	1208	8	G-C	Ser-Thr
S366G	1213	8	A-G	Ser-Gly
S366N	1214	8	G-A	Ser-Asn
T369M	1223	8	C-T	Thr-Met
N370S	1226	9	A-G	Asn-Ser
G377S	1246	9	G-A	Gly-Ser
W378G	1249	9	T-G	Trp-Gly
D380N	1255	9	G-A	Asp-Asn
D380A	1256	9	A-C	Asp-Ala
P387L	1277	9	C-T	Pro-Leu
G389E	1283	9	G-A	Gly-Glu
P391L	1289	9	C-T	Pro-Leu
N392I	1292	9	A-T	Asn-Ile
V394L	1297	9	G-T	Val-Leu
R395C	1300	9	C-T	Arg-Cys
N396T	1304	9	A-C	Asn-Thr
V398L	1309	9	G-C	Val-Leu
D399N	1312	9	G-A	Asp-Asn
D409H	1342	9	G-C	Asp-His
D409V	1343	9	A-T	Asp-Val
Y412H	1351	9	T-C	Tyr-His
K413Q	1354	9	A-C	Lys-Gln
P415R	1361	9	C-G	Pro-Arg
F417V	1366	9	T-G	Phe-Val
Y418C	1370	9	A-G	Tyr-Cys
K425E	1390	10	A-G	Lys-Glu
L413R		10		Leu-Arg
R433G	1413	10	A-G	Arg-Gly
L444P	1448	10	T-C	Leu-Pro
L444R	1448	10	T-G	Leu-Arg
N462R	1503	10	C-G	Asn-Lys
R463C	1504	10	C-T	Arg-Cys
R463H	1505	10	G-A	Arg-His
K466K	1515	11	G-A	Lys-Lys
G478S	1549	11	G-A	Gly-Ser

- INTRODUCCIÓN -

Alelo	cDNA	Exón	Sustitución nucleótido	Cambio aminoácido
T419I	1584	11	C-T	Thr-Ile
R495H	1601	11	G-A	Arg-His
R496C	1603	11	C-T	Arg-Cys
R496H	1604	11	G-A	Arg-His

Tabla 3. Mutaciones que producen un codón de parada.

Alelo	cDNA	Exón	Sustitución nucleótido	Cambio aminoácido
K74X	337	4	A-T	Lys-Stop
R163X	604	6	C-T	Gln-Stop
Q169X	622	6	C-T	Gln-Stop
S173X	635	6	C-G	Ser-Stop
W179X	653	6	G-A	Trp-Stop
233X	814	7	G-T	Glu-Stop
R257X	886	7	C-T	Arg-Stop
P266X	914	7	Cdel	Pro-Stop
R359X	1192	8	C-T	Arg-Stop
N370X	1227	9	C-A	Asn-Stop
W393X		9		Trp-Stop
Q414X	1357	9	C-T	Gln-Stop

Tabla 4. Mutaciones que dan lugar a un cambio en la pauta de lectura, afectan al ajuste, deleciones o inserciones.

Alelo	cDNA	Exón	Sustitución nucleótido	Cambio aminoácido
72del	72	2	Cdel	Cambio pauta-Stop
84GG	84	2	G-GG	Cambio pauta
IVS2	IVS2 ⁺¹		g-a (+1 intrón 2)	Ajuste
122CC	122	3	C-CC	Cambio pauta-Stop
203Cdel	203	3	Cdel	Cambio pauta
500Tins	500	5	Tins	Cambio pauta
914del	914	7	Cdel	Cambio pauta

- INTRODUCCIÓN -

Alelo	cDNA	Exón	Sustitución nucleótido	Cambio aminoácido
IVS5	IVS5 ⁺¹		g-t	Cambio pauta
1098ins	1098	8	A-ins	Cambio pauta-Stop
Delta 55	1263-1317	9	Delección	55 pb (Cambio pauta)
1447-1466			del TG ins	Cambio pauta
del, TG ins	1447-1466	10		
1451delAG	1451-1452	10	del AC	Cambio pauta
IVS10	IVS10 ⁻¹	10	G-A (-1 intrón 10)	Ayuste
t ins				
IVS10(+2)	IVS10 ⁺²	10	T-G	Ayuste
Delección completa del gen				

Tabla 5. Reorganizaciones genéticas causantes de la EG.

	Nucleótidos implicados	Exón/es
AZRecTL*	1.342-1.597	9,10,11
Complex C**	475-754	5,6
Complex A o Rec Ncl*	1.448-1.597	10
Complex B o Rec TL*	1.342-5.179 <1.255->1.263	9,10

*Se encuentra en el pseudogen. ** Seis de las siete mutaciones se encuentran en el pseudogen.

3.3.4 Distribución de mutaciones en la población

La distribución de mutaciones en la población resulta ser muy heterogénea dependiendo fundamentalmente de las características étnicas de la población. Así la frecuencia alélica recientemente reportada por el Registro Internacional de EG que incluía a 1698 pacientes de todo el mundo se veía afectada por la mayor población de judíos ashkenazi (hasta un 68% del Registro) (141). Así la mutación más prevalente era como cabía esperar la N370S con una frecuencia del 53% y la L444P del 18%. Entre los pacientes afectados de EG tipo I un 82% tenían uno de los siguientes 4 genotipos: N370S/?, N370S/N370S, N370S/L444P y N370S/84GG; el 87% de los afectados de EG tipo 3 presentaban el genotipo L444P/L444P. Aunque 39 (75%) de los 52 pacientes

- INTRODUCCIÓN -

homozigotos para la mutación L444P presentaban la forma neuropática de la enfermedad, hasta 13 pacientes (25%) presentaban con dicho genotipo una EG tipo I. Es llamativo que siendo la serie más amplia conocida no se ha encontrado algunos genotipos que cabría esperar en base a la frecuencia génica; homocigosidad para las mutaciones 84GG y IVS2+1 (141). Esto puede reflejar que quizás el tamaño muestral continúa siendo pequeño o muy posiblemente la letalidad intraútero de estos genotipos.

Mutaciones en población de judíos ashkenazi

En la población de judíos ashkenazi existe un predominio absoluto de la mutación N370S (77%), seguida a gran distancia de la 84GG (13%). La mutación L444P, frecuente en población no ashkenazi, tiene una frecuencia de 3% en este grupo. En cuarto lugar se sitúa la mutación IVS2+1 (mutación en el intrón 2 que altera el proceso de ajuste) con una frecuencia de 2.5%. Otras mutaciones presentan una frecuencia muy reducida en esta población (142). El hecho de que en pacientes de esta población se haya encontrado una frecuencia para dos mutaciones mayor del 90% permite la realización de estudios de “screening” poblacional para las mutaciones más habituales de la enfermedad. Concretamente Beutler en 1993 (35) presenta los resultados de un estudio de “screening” de las cuatro mutaciones más prevalentes (N370S, 84GG, L444P y IVS2+1) en una población de 2305 judíos de origen ashkenazi. La frecuencia génica de la mutación N370S en este grupo fue de 0.032 y para la mutación 84GG 0.00217. No se encontró ningún individuo portador de las mutaciones L444P y IVS2+1. A raíz de este “screening” se pudo comprobar como la relación entre las dos mutaciones más prevalentes (N370S/84GG) era mayor en la población general (14.8:1) que el encontrado en pacientes diagnosticados de EG (6.38:1); por lo que la frecuencia real de la mutación N370S debería ser mayor que la previamente calculada de 77%. Esto se debe presumiblemente a que un porcentaje importante de individuos homozigotos para la mutación N370S dado su curso más benigno y en ocasiones asintomático no estarían diagnosticados en esta población.

Todos estos datos recogidos de la literatura en los primeros años de la década de los 90, se confirman en los estudios más recientes realizados en los últimos años. Así en un estudio reciente del grupo de Koprivica (143) donde se analizan las mutaciones de 64 pacientes de origen ashkenazi y 64 que no lo eran, confirman que la búsqueda de las cuatro mutaciones en la población ashkenazi permite identificar el 93% de los alelos

- INTRODUCCIÓN -

mutados en esa población y la distribución de frecuencia génica es semejante a la observada en estudios previos (144, 145).

Mutaciones en población de origen no judío

Desde hace muchos años se conoce que la EG, en general, es más grave entre los individuos afectados no judíos que en aquellos (146). Como se ha señalado el estado de homocigoto para la mutación N370S es claramente más favorable, se asocia con un comienzo más tardío y la enfermedad es mucho más estable que cuando se presentan otros genotipos. Dado que esta mutación es la más prevalente en población judía es fácil encontrar individuos homocigotos, por el contrario en población no judía su frecuencia es menor y sólo un pequeño porcentaje de casos presentan dicho genotipo. La gran heterogeneidad en las mutaciones de esta población es la característica diferencial con la población judía (147). Como consecuencia directa de ello mientras el análisis de las mutaciones N370S, 84GG, L444P y IVS2+1 permite identificar más del 90% de los alelos mutados en población judía, sólo identifica el 62% en población no judía; donde con gran frecuencia encontramos mutaciones presentes únicamente en una familia con EG. Koprivica (143) en el análisis mutacional de 64 pacientes no judíos afectados de EG tipo I identifica mediante estudios de secuenciación hasta un 97% de las mutaciones presentes. La mutación más prevalente en este grupo era la L444P con una frecuencia de 37.5%, seguida a continuación por la N370S con una frecuencia de 34.3%. Es significativo que en esta población un 30% de los pacientes presentan alelos recombinantes, algo no encontrado en población judía. En estos pacientes encontré hasta 5 lugares de recombinación entre el gen y pseudogen, localizados entre el intrón 8 y exón 10, región en el que el gen y pseudogen comparten una secuencia altamente homóloga (143).

Cuando se analizan de forma comparativa los genotipos que presentan los individuos no judíos afectados de EG tipo I en relación a la población de judíos ashkenazi destaca que ningún paciente en la serie de Koprivica presenta los tan frecuentes N370S/N370S y N370S/84GG. El genotipo más prevalente es el N370S/L444P presente en un 17.1% de los pacientes; sin embargo lo más llamativo la gran heterogeneidad presente en esta población como ha sido documentado en otras series (144,147).

- INTRODUCCIÓN -

En algunas poblaciones no existe constancia de la mutación N370S entre los individuos afectados de EG; este es el caso de la población japonesa donde la mutación más prevalente es, al igual que en otras poblaciones no judías y con una frecuencia relativa semejante, la L444P (41%) (148). Ningún caso ha sido identificado con la mutación N370S. La mutación L444P es una mutación panétnica con distribución mundial. En segundo lugar en población japonesa se sitúa una mutación de origen asiático, la F213I, con una frecuencia alélica del 14%. Si bien inicialmente se había documentado el alto porcentaje de casos homocigotos para la mutación L444P con clínica compatible a la EG tipo I (148,149,150), en contraposición a lo que cabría esperar, en su evolución la mayoría de estos pacientes han desarrollado clínica neurológica como ocurre en población caucásica; solamente 3 de los 15 pacientes japoneses con dicho genotipo no han presentado en la actualidad clínica neurológica (151).

En otra población asiática es igualmente la mutación L444P la predominante con una frecuencia alélica del 42%. La mutación asiática F213I estaba presente en dos pacientes. Como ocurría en población japonesa la mutación N370S tampoco se presenta en esta población (152).

Una población no judía interesante desde este punto de vista es la argentina. En esta población a diferencia de otras poblaciones no judías la mutación L444P presenta una prevalencia significativamente menor con una frecuencia génica del 6.5% que le relega al tercer lugar. La mutación N370S es la más prevalente con una frecuencia mayor que en otras poblaciones no judías (47%) y lo más destacado es la alta prevalencia de la mutación RecNciI (21%) (153). Esta recombinación es menor al 8% según se ha comunicado en otras poblaciones; muy infrecuente en población ashkenazi (142, 154), oscilando entre 3% en población española (155) y 7% en población australiana (156) o 8% en una población no judía estudiada por Horowitz (154). Hay que tener en cuenta que en algunas ocasiones casos de RecNciI pueden ser considerados erróneamente como L444P sino se analizan otras mutaciones presentes en el alelo (153).

Mutaciones en población española

En la última referencia del Registro Español de EG (REEG) (157), la mutación más frecuente en un grupo de 108 pacientes no relacionados era la N370S que se presentaba en el 46% del total de alelos como había sido comunicado previamente en España,

- INTRODUCCIÓN -

seguida por la L444P con una frecuencia de 18.5%. El genotipo más frecuente era el N370S/L444P (36.8%). El 9.6% de los pacientes estudiados presentaban la mutación N370S en homocigosidad. Una frecuencia relativamente elevada de este genotipo cabría esperarse debido a que se trata de la mutación más prevalente; sin embargo si lo comparamos con la frecuencia reportada en otras poblaciones no judías es elevada (143). En ello puede influir una mayor frecuencia de dicha mutación en España en relación a otros países europeos donde existe una mayor frecuencia de la mutación L444P y a un posible mayor número de diagnósticos de estos pacientes casi asintomáticos.

En tercer lugar encontramos con una frecuencia de un 3.7% (8 casos) la presencia de deleciones o recombinaciones con el pseudogen; cuyo diagnóstico ha aumentado en los últimos años. Esta frecuencia es semejante a la encontrada en otras poblaciones de origen no judío (158). En este estudio es llamativo el hecho de que la mutación G377S es la tercera más frecuente (6 casos). Está mutación también se ha encontrado con una relativa elevada frecuencia en pacientes portugueses con EG (159). En el reciente Registro la mutación D409H ocupa un quinto lugar en frecuencia alélica (1.3%), con un caso homocigoto. Sin embargo existen otros casos descritos de este peculiar genotipo en población española (160,161), lo que convierten a esta mutación en una de las más prevalentes en nuestra población y por lo tanto a tener en cuenta en el diagnóstico genético de EG.

Algo más del 70% de los alelos identificados en el REEG corresponden a las mutaciones antes citadas (Tabla 6); lo que habla de una menor heterogeneidad que en otras poblaciones de origen no judío donde el “screening” de las cuatro mutaciones más prevalentes sólo permite identificar aproximadamente el 60% (143).

Los 11 genotipos (excluidos el N370S/N370S y N370S/L444P) son exclusivos de población española: N370S/T134P, N370S/G195W, N370S/G202R, N370S/1451delAC, N370S/Y313H, N370S/P391L, G377S/G195W, G377S/G377S, G377S/R436C.

Tabla 6. Frecuencia de las mutaciones del GBA en pacientes españoles

Mutación	Nº de alelos	Porcentaje
N370S	100	46.3
L444P	40	18.5
Del / Rec	8	3.7
G377S	6	2.7
D409H	3	1.3
G195W	2	0.8
T134P	2	0.8
R436C	2	0.8
G202R	1	
Y313H	1	
E326K	1	
1451delAC	1	
P391L	1	
Desconocida	48	22.2

Hasta la fecha las siguientes mutaciones del gen de la glucocerebrosidasa han sido descritas por primera vez en pacientes de origen español: G195W (un paciente afecto de una forma tipo I y otro 3) (162), Rec (1263del55; 1342G>C), 1098insA, Y313H, I402T, V375L, T134P, S364N, P391L, G113E, G389E, N392I, Y412H, W(-4)X, Q169X, R257X, 500insT, IVS5+1 (163,164,165) y más recientemente G325W (2 hermanos afectados de EG tipo I moderada con genotipo N370S/G325W) (166) .

Además de las mutaciones citadas en el gen de la glucocerebrosidasa, cabe destacar el diagnóstico en un paciente español con afectación neurológica del segundo caso de déficit del activador sap C (113,123).

3.3.5 Características de las mutaciones más prevalentes

Mutación N370S (1226G): Su origen se encuentra en la sustitución de una base nitrogenada adenina (A) por una guanina (G) en la posición 5841 del gen, dando lugar a un aminoácido serina en vez de asparragina. Fue descrita por primera vez por Tsuji en 1988 (167) y es el alelo más prevalente entre los pacientes con EG, apareciendo entre un 70-80% en los pacientes judíos (142,143) comparado con una frecuencia variable

- INTRODUCCIÓN -

aunque netamente menor en poblaciones de origen no judío (23%-46%) (143,154,157). En raza judía ashkenazi se ha calculado una frecuencia de portadores de dicho alelo defectuoso entre 0.023-0.034 (34,35).

La existencia del alelo N370S predice la existencia de una EG tipo I. La presencia de esta mutación en homocigosis está asociada de forma invariable a enfermedad tipo I que con frecuencia lleva a un diagnóstico más tardío que con otras mutaciones (34,168,169), sin embargo en el último Registro mundial de EG (141) se ha comprobado como existe un diagnóstico más temprano (27.2 años por término medio) de estos pacientes en relación a estudios previos (170) en muchas ocasiones condicionado por estudios familiares en individuos asintomáticos (171) e incluso programas de búsqueda en población sana de origen judío(35). En los individuos heterocigotos para la mutación N370S la gravedad de la enfermedad viene determinada por el otro alelo defectuoso. Cuando la mutación N370S se encuentra en heterocigosis con otras mutaciones (a excepción de 84GG o deleciones / recombinaciones) el diagnóstico según datos del último Registro oscila entre los 16 y 20 años de edad; situándose más próximo a los 16 años cuando se presenta con la mutación L444P (141).

Existen datos contradictorios en relación al origen en el tiempo de la mutación N370S. Recientemente Díaz (172,173) propone un origen antiguo de la mutación N370S en población de judíos ashkenazi y española en base a que ambas poseen un haplotipo semejante para marcadores asociados y una estimación que sugiere que esta mutación apareció hace varios miles de años. Sin embargo, esto es contradictorio con otros estudios basados en complicados cálculos matemáticos que estiman el origen de esta mutación en la población ashkenazi entre los siglos XI y XIII (174). Este resultado resulta más consistente si tenemos en cuenta la época de aparición de otras mutaciones frecuentes también en esta población, a excepción del déficit del factor XI tipo II por la mutación E117X que se cree apareció hace más de 3000 años (175), en el momento de la separación de los judíos ashkenazi e iraquíes. Este hallazgo apoya la hipótesis de un origen por lo tanto más reciente de esta mutación y supone que posiblemente existiera tanto una transferencia del cromosoma a poblaciones europeas como un origen no judío en los individuos europeos que presenten dicha mutación (174).

- INTRODUCCIÓN -

Mutación L444P (1448C): Esta mutación resulta de la sustitución de una timina por citosina a nivel del nucleótido 6433 del gen de la glucocerebrosidasa, dando lugar a un aminoácido prolina en vez de leucina y creando un punto de restricción para la enzima Nci. Fue descrita por primera vez por Tsuji en 1987 (176) en un paciente con EG tipo 2, aunque posteriormente se ha encontrado en todos los tipos de EG. En la EG tipo I se presenta en heterocigosis, en la tipo 2 habitualmente en heterocigosis y en la tipo 3 es frecuente en homocigosis (143). Los ya mencionados pacientes con EG tipo Norrbottnian son todos homocigotos para la mutación L444P (177). Sin embargo en los últimos años han surgido dudas en relación a la correlación genotipo-fenotipo de esta mutación. En primer lugar aquellos casos homocigotos para la mutación y afectados de una forma tipo 2 de la enfermedad descritos en la literatura posiblemente obedecen a la existencia de un alelo recombinante y no homocigosis de la mutación L444P (143). Además y como se ha comunicado en la literatura en diversos casos existen individuos homocigotos para la L444P que no presentan sintomatología neurológica (143, 178, 179); sin embargo en muchos de estos casos se trata pacientes de escasa edad y como se ha visto en la serie más amplia de individuos homocigotos para esta mutación en su evolución la mayoría están desarrollando clínica neurológica (151).

La mutación L444P es en general la mutación más prevalente en población de origen no judío (143), con excepción de algunas poblaciones como la española (157,171). En los casos en que se presenta en homocigosis la edad media de diagnóstico según datos del Registro mundial (141) es 2.3 años. En heterocigosis dependerá la segunda mutación; en el caso de la N370S aproximadamente a los 16 años (141).

Mutación 84GG: El alelo 84GG designa la inserción de una G en la posición 84 del c-DNA dando lugar a un cambio en la pauta de lectura y a la terminación prematura de la síntesis proteica, sintetizándose una cadena polipeptídica de 44 aminoácidos. Esta mutación es la segunda más común entre los pacientes judíos de origen ashkenazi, donde se encuentra en un 13 % de los alelos mutados(154). Excepto algún caso aislado descrito en la literatura, se puede decir que esta mutación es exclusiva de la raza judía (180), habiéndose encontrado una frecuencia de dicho alelo entre los judíos ashkenazi de 0.00217 (35). Esta mutación se encuentra en los pacientes con EG tipo 1 y habitualmente se presenta como afectación grave de la enfermedad; de hecho, se supone

- INTRODUCCIÓN -

que esta mutación debe ser letal para el feto puesto que no se ha encontrado ningún paciente con dicho alelo en homocigosidad.

En heterocigosidad con la mutación N370S según datos del Registro mundial de EG (141) la edad media de diagnóstico en los 93 pacientes registrados corresponde a los 8.7 años.

En contraste con la mutación N370S, la 84GG es exclusiva de la población judía y parece tener aproximadamente el mismo origen en el tiempo en esta población que la N370S según Díaz (173), hace unas 55 generaciones.

Mutación IVS2+1: Esta mutación acontece debido a la presencia de una adenina que substituye a una guanina, en el primer nucleótido del segundo intrón del gen de la glucocerebrosidasa. Debido a esto, se pierde la secuencia “GT” (pasando a “AT”) que constituye la señal necesaria para el reconocimiento y realización del proceso de ajuste del mRNA, dando lugar un mRNA aberrante que no sintetiza proteína (181). Esta mutación representa el 1-3% de los alelos entre los pacientes judíos y no judíos con EG (154). En cuanto al tipo 1 de enfermedad, la forma en que ha sido encontrada más frecuentemente es como portadora del fenotipo N370S/IVS2+1, y siempre se presenta como una forma moderada-grave de enfermedad. Se ha descrito el caso de un paciente de origen judío con EG tipo 2 que presentaba el genotipo L444P/IVS2+1, diagnosticado antes del nacimiento y que falleció a la edad de 8 meses (154). Entre los pacientes no judíos, la mutación ha sido encontrada en 2 pacientes de entre 69 con afectación neuronopática: uno de ellos tenía una EG tipo 2 con un genotipo D409H/IVS2+1, mientras el otro tenía una EG tipo 3 con un genotipo R463C/IVS2+1 (154). En la reciente serie de Koprovcica (143) en población no judía no se encontró ningún individuo con esta mutación y EG tipo I, los casos detectados eran formas neuronopáticas y si se presentaba junto a la mutación L444P invariablemente correspondía a una forma tipo 2.

La edad de aparición de la sintomatología va a estar en dependencia de la mutación asociada. En población de origen no ashkenazi y correspondiendo a formas neuronopáticas su debut se da en los primeros años de la vida (143); en combinación con la mutación N370S (situación frecuente en población judía) según el Registro

- INTRODUCCIÓN -

Mundial los 17 casos registrados tenían una edad media en el diagnóstico de 6.4 años (141).

Mutación D409H (1342C): Esta mutación es originada por la aparición de una citosina en vez de guanina en el nucleótido 5957 del gen de la glucocerebrosidasa, de tal manera que da lugar a la síntesis de histidina y no de ácido aspártico (182,183). Constituye una mutación que está presente en el pseudogen y solamente ha sido encontrada en pacientes no judíos, con una prevalencia variable 1.3-5% (157,182,183). Los pacientes que presentan la mutación en homocigosis tienen un fenotipo peculiar con apraxia oculomotora junto a esclerosis valvular cardiaca que origina estenosis aórtica (143). Debido a su afectación neurológica estos pacientes han sido clasificados en un principio como EG tipo 3; sin embargo, no presentan otra afectación neurológica o un gran afectación visceral. Esto ha hecho que desde hace unos años se clasifique a estos enfermos, con este genotipo y fenotipo característicos, como pertenecientes al tipo 3C de EG (184).

Alelos recombinantes: La secuenciación de clones de c-DNA de gran cantidad de pacientes ha dado lugar al hallazgo de alelos complejos con varias mutaciones. Así por ejemplo se han descrito:

- Alelo recNciI: contiene la mutación L444P asociada a las mutaciones A456P y V460V (125). Este alelo recombinante tiene una elevada prevalencia en población argentina (21%) (153) frente a una frecuencia en población no judía de un 7.8% (154) y una prácticamente nula presencia en población ashkenazi (142,154). Hay que tener en cuenta que en algunas ocasiones casos de RecNciI se han considerado erróneamente como L444P al no analizarse otras mutaciones presentes en el alelo (153).
- Alelo recTL: contiene las mutaciones anteriores en asociación con la D409H (125).
- Alelo que asocia las mutaciones anteriores con la presencia de la delección de 55 nucleótidos a nivel del exón 9 (185). En población española existe un alta prevalencia de falsos N370S homocigotos como consecuencia de dicha delección (186).
- Alelo L444P asociado con V460V (144).
- Alelo que asocia las mutaciones R120W + W184R + N188K + V191G + S196P + G202R + F213I (144).

La presencia de un alelo de recombinación se asocia invariablemente con una EG tipo I grave o una forma neuronopática.

3.3.6 Correlación genotipo-fenotipo

Determinadas mutaciones como la N370S y la V394L permiten la síntesis de un enzima con una variable actividad residual. En el otro extremo se sitúan mutaciones como la 84GG que provoca un cambio en la pauta de lectura “*frameshift*”, de manera que no existe síntesis alguna del enzima. De forma similar ocurre con la mutación en el primer nucleótido del intrón 2 (IVS2+1) con la que no existe síntesis del enzima. Como consecuencia de estas circunstancias sería previsible que existiera alguna relación entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes (29).

Y hasta ciertos límites se conocen determinadas relaciones. Como se ha comentado previamente la homocigosidad para la mutación L444P predispone para la existencia de una forma neuronopática de la enfermedad (29). Es más, hoy en día sabemos que probablemente la presencia de esta mutación en homocigosis nos tiene que hacer pensar en una EG tipo 3; ya que para presentar una EG tipo 2 es preciso un alelo con actividad nula (recombinaciones) y que muchos de los casos descritos como EG tipo 2 y homocigotos para la mutación L444P eran realmente falsos homocigotos para dicha mutación (143) y que posiblemente otras mutaciones derivadas del pseudogen puedan estar presentes (187). En la población de Norrbottnian en que la característica genética es la homocigosidad para la mutación L444P solo se presenta la forma clínica tipo 3 y no la 2 lo que corrobora la afirmación anterior (177). Incluso en población japonesa donde existían numerosos casos descritos de niños con EG tipo I y homocigosidad para la mutación L444P (143,178,179), hoy en día se está demostrando que estos pacientes en su evolución posterior está desarrollando sintomatología neurológica, por lo que debemos hablar de individuos afectados de EG tipo 3 (151). La presencia de la mutación N370S parece prevenir el desarrollo de una EG tipo 2 ó 3 (29). Y como cabría esperar la enfermedad es más bien leve en aquellos individuos homocigotos para dicha mutación en relación a aquellos otros que comparten dicha mutación con mutaciones consideradas más graves (N370S/L444P ó N370S/84GG) (36). Está claro que aquellos individuos con genotipos distintos a la homocigosidad para la mutación N370S desarrollaran más probablemente enfermedad ósea, afectación hepática y esplénica más

- INTRODUCCIÓN -

graves y inicio de la sintomatología más precoz (168). En el Registro Internacional de EG (141) podemos comprobar como la edad de inicio de la enfermedad, a pesar de que progresivamente el diagnóstico está siendo más precoz, en los individuos homocigotos para la mutación N370S es por término medio los 27 años, frente a los 16 años en los individuos N370S/L444P ó 8 años en los N370S/84GG y 6 años en N370S/IVS2+1. Los individuos que son diagnosticados en edades adultas o incluso avanzadas presentan de forma invariable homocigosis para la mutación N370S (29).

Sin embargo es obvio que existen diferencias en la expresión clínica de los diferentes genotipos, con importantes variaciones intragrupo. Se han comunicado pacientes afectados de la mutación N370S en homocigosis manifestando EG tipo I moderadamente severa mientras que algunos pacientes con los genotipos N370S/84GG y N370S/L444P presentan formas leves (142,168,169). No existen suficiente información para asegurar cuanto de estas variaciones son interfamiliares, intrafamiliares, y cuanto puede deberse a factores ambientales (29).

En relación a aquellos individuos portadores de alelos complejos con varias mutaciones, que habitualmente presentan formas graves de la enfermedad (143); ésta va a estar relacionada con las características de las mutaciones asociadas; así individuos con el complejo L444P+E326K presentan la variante 2 de la EG; sin embargo pacientes con la asociación D140H+E326K, y debido a que la mutación D140H posee una mayor actividad residual presentan formas de la enfermedad más leves (188).

En relación al fenotipo se han propuesto las siguientes combinaciones (Tabla 7) de acuerdo a la clasificación clásica en “alelos nulos” (mutaciones que impiden que se sintetice el enzima) (Tabla 8), “alelos graves” (cambian un solo aminoácido y se encuentran en pacientes afectados de formas neuronopáticas) (Tabla 9) y “alelos leves” (encontradas en pacientes con EG tipo 1 bien en homocigosis o en heterocigosis con otras mutaciones que se conocen como leves) (Tabla 10):

- INTRODUCCIÓN -

Tabla 7. Interacción entre los diferentes tipos de mutaciones en la EG.

	Alelo nulo	Alelo grave	Alelo leve
Alelo nulo	No viable	Tipo II / III	Tipo I
Alelo grave	Tipo II / III	Tipo II / III	Tipo I
Alelo leve	Tipo I	Tipo I	Tipo I

Tabla 8. Mutaciones del gen de la Glucocerebrosidasa. Alelos nulos.

Mutación en cDNA	Mutación en aminoácido	Exón/Intrón
72 del C	cambio de pauta	2
84C-GG	cambio de pauta	2
IVS2+1G/A	ajuste	intrón 2
203 del C	cambio de pauta	3
A337T	K74Stop	4
C635G	S173Stop	6
C653A	W179Stop	6
C1192T	R359Stop	8
1263-1317 (del 55pb)	cambio de pauta	9
C1357T	Q414Stop	9
1447-1466del, TG ins	cambio de pauta	10
1451delAG	cambio de pauta	10
C1505A	ajuste	10
IV10+2T/G	ajuste	intrón 10
Delección todo gen	del	1-11

- INTRODUCCIÓN -

Tabla 9. Mutaciones del gen de la Glucocerebrosidasa. Alelos graves.

Mutación en cDNA	Mutación en aminoácido	Fenotipo
A586C	K157Q	2
C649T	P178S	2
G721A	G202R	?
T754A	F213I	3
G1090A	G325R	2
G1093A	E326K	3
T1141G	C342G	2
G1297T	V394L	3
G1309C	V398L	3
G1312A	D399N	2
G1361G	P415R	2,3
G1342C	D409H	3
A1343T	D409V	3
A1390G	K425E	3
T1448C	L444P	2,3
C1505A	R463C	3
C1589T	T491I	3

Tabla 10. Mutaciones del gen de la Glucocerebrosidasa. Alelos leves.

Mutación en cDNA	Mutación en aminoácido	Exón/Intrón
G160T	V15L	2
G254A	G46E	3
C259T	R48W	3
G354C	K79N	4
C481T	P122S	5
A680G	N188S	6
T764A	F216Y	7
C914G	P266R	7
C983T	P289L	7
G1053T	W312C	8
G1193A	R359Q	8
G1208C	S364T	8
A1226G	N370S	9
G1246A	G377S	9
A1304C	N396T	9
C1603T	R496C	11
G1604A	R496H	11

4. ASPECTOS CLÍNICOS

Las manifestaciones clínicas de la EG van a estar condicionadas por el acúmulo del material no degradado a nivel de los macrófagos; que son las células especializadas en la eliminación de residuos celulares (179). Realmente el macrófago es el protagonista de esta enfermedad y su complejidad funcional puede ser un factor determinante en la variabilidad clínica de las manifestaciones de la enfermedad (189). Cualquier tejido u órgano en el que se localizan estas células puede verse afectado en la EG; pero fundamentalmente órganos diana van a ser médula ósea, hígado y bazo.

4.1 Clasificación clínica

Clásicamente se ha distinguido tres tipos de EG (Tabla 11). Esta división fue propuesta por primera vez en 1962 por Knudson y Kaplan (190). El término EG tipo 1 se reserva a aquellos casos en los que no existe ningún tipo de afectación neurológica (179). La EG tipo 2 o infantil neuronopática conlleva un pronóstico sombrío y puede ser separada claramente de las otras dos variantes. La EG tipo 3 originalmente descrita en los pacientes Norrbottnian de Suecia (177) debe ser definida como EG neuronopática que no es un tipo 2. Se han realizado intentos para distinguir diferentes subtipos dentro de la EG tipo 3 (184): algunos pacientes presentan afectación neuronopática progresiva con comienzo en la adolescencia (Tipo 3a); mientras otros presentan una hepatoesplenomegalia muy importante y enfermedad ósea y como afectación neurológica exclusiva apraxia oculomotora progresiva (Tipo 3b). Las características clínicas asociadas con la homocigosidad para la mutación D409H han sido clasificadas recientemente como EG tipo 3c.

Tabla 11. Subtipos clínicos en la Enfermedad de Gaucher (179)

Manifestación	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3a	Tipo 3b	Tipo 3c
Comienzo	>1 año	<1 año	>10 años	<5 años	2-20 años
Hepatoesplenomegalia	++	±	±	+++	+
Enfermedad ósea	++	-	-	+++	-
Enfermedad cardiaca valvular	-	-	-	-	+++
Afectación neurológica progr.	-	-	+	-	±
Apraxia oculomotora	-	+	+	+	+
Opacidades corneales	-	-	-	-	+
Fallecimiento	60 años	<3 años	<20 años	30 años	<20 años

4.2 Enfermedad de Gaucher tipo I

4.2.1 Frecuencia de la enfermedad

La enfermedad de Gaucher tipo I es la más frecuente de las esfingolipidosis humanas, constituye una entidad importante del grupo de enfermedades lisosomales. Su frecuencia es reducida, estimándose aproximadamente 1/200.000 habitantes (179); siendo más frecuente como ya se ha dicho en población judía de origen ashkenazi, donde la incidencia esperada a partir de estudios de screening poblacional es de 1 caso por 855 nacimientos (35). Estudios realizados en poblaciones diferentes revelan prevalencias distintas; así en Holanda (37) su frecuencia es de 1.16/100.000 nacimientos y en Australia (38) de 1 caso por 57.000 nacimientos. Por el contrario en población española la prevalencia según datos del REEG se situaría en 1/300.000 (157), lo que seguramente se sitúa lejos de la realidad al existir casos no incluidos en el Registro y otros no detectados por su curso asintomático.

4.2.2 Manifestaciones clínicas más habituales

La EG se caracteriza por su polimorfismo clínico, que implica una variada sintomatología tanto en el inicio de sus manifestaciones como en la intensidad de las mismas (191,192). Aproximadamente un 10% de los pacientes no presentan sintomatología detectándose la enfermedad en el curso de un estudio familiar; en otras ocasiones puede pasar desapercibida a lo largo de la vida como consecuencia de sus escasas manifestaciones clínicas.

Astenia. En los pacientes sintomáticos un dato semiológico habitual es la astenia / adinamia que se interpreta como relacionada con la alteración del metabolismo glucolipídico (193). Sin embargo, este cansancio crónico es muchas veces percibido sólo de forma retrospectiva, cuando tras recibir TES, realizan sus actividades con mayor energía y bienestar. Este punto ha sido destacado en algunas encuestas efectuadas sobre la calidad de vida en los pacientes sometidos a TES (194).

Manifestaciones viscerales. La sintomatología en la EG es en muchos casos resultado de la esplenomegalia y el consiguiente hiperesplenismo (anemia, tendencia hemorrágica consecuencia directa de la trombocitopenia y en ocasiones infecciones bacterianas recurrentes relacionadas con neutropenia) (179). La esplenomegalia junto con hemorragias recurrentes tras traumatismos menores, procedimientos quirúrgicos leves

incluyendo extracciones dentarias, obligan a realizar un recuento sanguíneo y exámenes completos con la sospecha de una posible enfermedad hematológica maligna (195). Un recuento sanguíneo anormal asociado a hepatomegalia y alteraciones séricas de la función hepática llevan a la realización de estudios ecográficos y radiológicos seguidos de biopsia de médula ósea o tejido hepático.

Manifestaciones óseas. De forma retrospectiva es fácil encontrar antecedentes de dolores óseos y diagnósticos de osteocondritis afectando especialmente a las epífisis femorales; incluso el diagnóstico de una enfermedad de Perthes es posible. En alguna ocasión el diagnóstico de EG es posible debido a la existencia de enfermedad ósea, habitualmente tras un episodio de necrosis avascular (cadera o húmero) o fracturas de vertebras necróticas (179).

Los niños con manifestaciones precoces de EG tipo 1 presentan generalmente menor desarrollo estatuponderal e infantilismo con retraso en la aparición de caracteres sexuales secundarios (179).

4.2.3 Examen clínico

El paciente con EG puede presentar a la exploración palidez, distensión abdominal como consecuencia de las visceromegalias y tener signos cutáneos de tendencia hemorrágica con púrpura o equimosis. Los niños con EG de inicio temprano característicamente muestran retraso de crecimiento y con frecuencia retraso en la maduración sexual. Las manifestaciones cutáneas de la enfermedad de Gaucher incluyen pigmentación generalizada en casos de larga evolución, eritema malar y pinguécula. Estos depósitos de aspecto triangular de color amarelento o marrón aparecen en la zona lateral de la esclera y parecen obedecer más que al acúmulo de material glucolipídico a procesos de elastosis y rotura de fibras de colágeno. El eritema malar se presenta frecuentemente en pacientes con EG grave de aparición temprana. El eritema palmar y las arañas vasculares presentes en algunos pacientes son resultado de la infiltración hepática. Puede existir ictericia siendo este un elemento característico en pacientes dependientes de frecuentes transfusiones secundarias al hiperesplenismo. En casos más raros y como consecuencia de enfermedad pulmonar se puede encontrar dedos en palillos de tambor asociado con cianosis central (179).

- INTRODUCCIÓN -

En relación al hábito corporal del paciente es fácil encontrar deformidades como consecuencia de la enfermedad ósea: fracturas vertebrales por compresión que provocan cifoescoliosis; destrucciones articulares resultado de focos de necrosis avascular epifisarios en el fémur y húmero proximal que dan lugar a deformidades en la cadera y hombros. Otras deformidades son consecuencia de fracturas patológicas que tienen lugar sobre el hueso osteoporótico o zonas de osteolisis focal (179).

Mediante palpación se pueden objetivar linfadenopatías móviles especialmente en región axilar o suboccipital. Su textura suele ser rugosa y rara vez exceden los 1.5 centímetros de diámetro. En pacientes con enfermedad pulmonar se puede demostrar a la exploración signos de hipertensión pulmonar con aumento de la presión venosa yugular, signo de Kussmaul positivo, aumento del componente pulmonar del segundo tono cardiaco e incluso signos de insuficiencia tricuspídea. El examen abdominal muestra aumentos entre moderados y masivos del hígado y bazo. En pacientes pediátricos esplenectomizados el tamaño hepático puede estar muy aumentado y a la palpación pueden detectarse grandes nódulos resultado de procesos previos de infarto y fibrosis (179). Los signos de hipertensión portal son muy raros en la EG sin embargo han sido descritos en algunos pacientes que han desarrollado infartos hepáticos recurrentes y cirrosis (196,197).

4.2.4 Enfermedad esplénica

La evidencia clínica de enfermedad esplénica está presente al menos en un 95% de los pacientes diagnosticados de EG (179). En el Registro Internacional se recoge que un 87% de los pacientes no esplenectomizados presentaban un volumen esplénico de al menos 5 veces el normal (141). Sin embargo existen grandes variaciones en lo que se refiere al tamaño esplénico, desde casos en los que se palpa justo por debajo de reborde costal y a otros que presentan importante distensión abdominal y el bazo alcanza la pelvis. En los pacientes pediátricos el tamaño esplénico parece relacionarse con retraso de crecimiento (195). En los adultos la esplenomegalia masiva puede asociar caquexia (193). Los pacientes que no han recibido TES, la progresión de la enfermedad esplénica es generalmente lenta, durante años, aunque posiblemente alcanza un punto crítico cuando el paciente presenta anemia que precisa transfusiones. Alcanzado ese punto un círculo vicioso de hiperesplenismo tiene lugar: las transfusiones de concentrados de hematíes se acompañan de marcados incrementos del tamaño esplénico como

consecuencia del secuestro y destrucción de los hematíes donantes. En ese caso la instauración rápida del TES o la esplenectomía se hacen necesarios (179).

En ocasiones el diagnóstico de EG puede deberse a la realización de una esplenectomía urgente tras un traumatismo que ocasiona rotura esplénica o hematoma subcapsular. El embarazo puede acelerar el aumento del tamaño esplénico. La aparición de lesiones focales, incluyendo lesiones hipoecoicas en bazo e hígado detectadas por ecografía, puede llevar erróneamente al diagnóstico de un proceso maligno (198). Los nódulos esplénicos con hematopoyesis extramedular, infartos focales y malformaciones vasculares se encuentran con frecuencia en las muestras anatomopatológicas.

Un dolor agudo en el hipocondrio izquierdo puede ser el comienzo de un infarto esplénico, lo que se asocia frecuentemente a la esplenomegalia masiva. En ocasiones puede acompañarse de fiebre y defensa abdominal. Cuando existe dolor referido al hombro (signo de Kehr) refleja irritación diafragmática. Estos síntomas suelen desaparecer en 2 o 3 semanas pero requieren instauración de analgesia adecuada. Los infartos esplénicos de gran tamaño se suelen acompañar de anomalías en las enzimas hepáticas y de hiperbilirrubinemia directa; puede existir además una disminución en los recuentos plaquetarios y coagulopatía de consumo. Los infartos esplénicos infectados precisan instauración rápida de terapia antimicrobiana parenteral para prevenir el desarrollo de abscesos esplénicos (179).

La esplenectomía puede ser necesaria en la fase de hiperesplenismo agudo. Otras indicaciones incluyen las citopenias que no responden al TES o efectos de compresión como podría ser hidronefrosis izquierda. En los niños se ha tenido en cuenta la posibilidad de realizar esplenectomías parciales considerando las implicaciones de una esplenectomía total sobre todo en la población infantil (179). Sin embargo, incluso tras la esplenectomía parcial o total se ha documentado la aparición de tejido esplénico (199).

4.2.5 Enfermedad hepática

Las células de Kupffer o histiocitos hepáticos son macrófagos especializados, los estudios microscópicos han demostrado que se trata de un lugar invariable de acúmulo anómalo de material glucolipídico no degradado en la EG tipo 1. El examen clínico demuestra hepatomegalia aproximadamente en el 70-80% de los pacientes con EG tipo

1 (179). Según datos del Registro Internacional el volumen hepático medio en aquellos individuos con bazo intacto era de 1.7 veces el normal. Un 77% presentaban un volumen 1.25 veces el normal; el 17% 2.5 veces. Sin embargo en aquellos individuos esplenectomizados el tamaño medio era de 2.2 veces el tamaño normal; el 88% presentaban un volumen 1.25 veces el normal y el 40% 2.5 veces. El volumen hepático era significativamente mayor en el grupo de pacientes esplenectomizados (141). Sin embargo son infrecuentes las complicaciones clínicas significativas presentándose en menos del 5% de los pacientes afectos. Sólo un 50% de los pacientes con hepatomegalia presentan alteraciones del funcionalismo y un 10% desarrollan hipertensión pulmonar (196). La existencia de ictericia, eritema palmar y arañas vasculares son visibles en pacientes con enfermedad de comienzo precoz, traduciendo mayor disfunción hepática y obligando a establecer el diagnóstico diferencial con cuadros de hepatopatía crónica originada por otras causas. Sólo un pequeño porcentaje muestran en estudios anatomopatológicos cirrosis; sin embargo la presencia de fibrosis es frecuente. En los estudios histológicos hepáticos se detectan septos fibrosos en el 25% de los pacientes. La fibrosis rodea a las células en la mayoría de los casos y el origen de la misma podría atribuirse en parte a la producción aumentada de algunas de las citoquinas que produce el macrófago en un intento de autodefensa del organismo para aislar los acúmulos acelulares o por desequilibrio en el metabolismo lipídico. Los signos de hipertensión portal como se ha comentado son infrecuentes en la EG, pero puede aparecer ascitis, dilataciones vasculares cutáneas, en abdomen y signos indirectos de cirrosis hepática. Cuando existe cirrosis e hipertensión portal se produce cianosis hepatógena llamada síndrome hepatopulmonar y los pacientes tiene dedos en palillo de tambor por fracaso de algunos mediadores metabólicos a nivel de lecho vascular pulmonar como el óxido nítrico. Los infartos hepáticos presentan datos clínicos semejantes a los esplénicos: fiebre, dolor en flanco derecho y región subcostal con signos de inflamación peritoneal (179).

4.2.6 Enfermedad de la médula ósea

La afectación difusa del sistema mononuclear fagocítico ha hecho difícil determinar los efectos propios de la infiltración de la médula ósea por las células de Gaucher en los pacientes con bazo intacto. En presencia de una gran esplenomegalia la contribución de la médula ósea a la gran variedad de anomalías hematológicas observadas en los pacientes con EG no está clara. Sin embargo, una vez que el paciente ha sido

esplenectomizado, los efectos intramedulares de la infiltración por células de Gaucher se hacen manifiestos. Característicamente, la EG se asocia con anemia macrocítica leve-moderada que refleja la afectación intrínseca de la médula ósea, asociada con trombocitopenia y leucopenia. La esplenectomía provoca aumento notable en el recuento plaquetario y la aparición de linfocitosis, monocitosis y cuerpos de Howell Jolly (179).

En ausencia de déficit de hierro (posiblemente relacionado con el exceso de pérdidas sanguíneas) la aparición de anemia en un paciente esplenectomizado sugiere inmediatamente fallo de la médula ósea. En esta situación la enfermedad ósea es constante (manifestada por necrosis avascular o más comúnmente osteopenia generalizada con desmineralización que lleva a osteoporosis en casos extremos, siendo posible encontrar cambios osteolíticos) (179). Sin tratamiento, el pronóstico de los pacientes con fallo de la médula ósea es grave, si bien es cierto que la anemia y otras citopenias que aparecen en los adultos varios años tras la esplenectomía responden de forma muy rápida al TES (200).

4.2.7 Manifestaciones hematológicas

Como se ha dicho previamente el sangrado es un síntoma de presentación común en los pacientes con EG (195). La causa es la trombocitopenia, aunque están descritas deficiencias asociadas de factor XI, si bien esto parece ser propio de la población ashkenazi (201). Sin embargo se han comunicado casos con fenómenos hemorrágicos y recuentos plaquetarios relativamente altos y test de coagulación normales (202) que sugieren alteraciones en la función plaquetaria. En un estudio reciente se ha comprobado como hasta un 22% de pacientes sin trombocitopenias graves presentaban trastornos de la agregación plaquetaria (203) La trombocitopenia es probablemente la anomalía hematológica más frecuente (29). En el Registro Internacional encontramos que entre los pacientes con bazo intacto el recuento plaquetario medio es de $85 \times 10^9/L$. Un 26% presentan recuentos plaquetarios inferiores a $60 \times 10^9/L$. En los pacientes esplenectomizados el recuento medio era de $219 \times 10^9/L$ y sólo un 3% presentaban recuentos inferiores a $60 \times 10^9/L$ (141). En fases tempranas su origen parece deberse a los secuestros esplénicos de plaquetas y responde a la esplenectomía (195). Sin embargo con la evolución de la enfermedad estos pacientes sometidos a esplenectomía pueden

volver a presentar este trastorno como consecuencia del fallo de médula ósea como se ha comentado.

La anemia es normalmente leve, pero en ocasiones puede ser importante con niveles de hemoglobina menores de 5 g/dL; su origen se encuentra en la hemólisis secundaria al hiperesplenismo, hemodilución, secuestro esplénico y en casos más avanzados (particularmente en los post-esplenectomizados) por depresión de la eritropoyesis asociada a infiltración de la médula ósea por las células de Gaucher (204). Según datos del Registro Internacional entre los pacientes con bazo intacto la hemoglobina media era de 11.2 g/dL, un 69% presentaban hemoglobinas inferiores a 12 g/dL y un 25% inferiores a 10 g/dL. En el grupo de pacientes esplenectomizados la hemoglobina media era de 12 g/dL, un 54% presentaban hemoglobinas inferiores a 12 g/dL y un 10% inferiores a 10 g/dL. Por lo tanto según estos datos la gravedad de la anemia se asociaba a la presencia de bazo (141).

La leucopenia también puede presentarse, aunque más infrecuentemente, en algunos pacientes, aunque en raras ocasiones contribuye a la aparición de infecciones bacterianas recurrentes (204).

4.2.8 Enfermedad ósea

Las alteraciones esqueléticas afectan a los pacientes con EG tipo 1 y 3 debido a que la mayoría de los pacientes afectados de EG tipo 2 raramente sobreviven más allá de los 2 años (29). La afectación esquelética es una causa importante de morbilidad pero con una gran variabilidad entre pacientes. Aproximadamente el 80% de los pacientes con EG presentan algún grado de afectación ósea y más de la mitad sufren complicaciones serias, incluyendo fracturas patológicas y osteonecrosis (205). Según datos del Registro Internacional de EG un 94% de los pacientes han presentado una o más manifestaciones de enfermedad ósea. Un 63% tienen historia de dolores óseos y al menos un 33% un episodio de crisis ósea. Las manifestaciones radiológicas más comunes eran la deformidad en matraz de Erlenmeyer (46%), osteopenia (42%), infiltración medular (40%), infartos (25%), necrosis avascular (25%) y manifestaciones múltiples (59%). Los pacientes esplenectomizados presentaban con mayor frecuencia historia de dolor óseo, crisis óseas y manifestaciones radiológicas de enfermedad grave que los no esplenectomizados (141). Este hecho ha sido comunicado por otros autores en

- INTRODUCCIÓN -

poblaciones con características génicas distintas (206). Las crisis óseas eran más frecuentes en aquellos pacientes con diagnóstico antes de los 10 años, aunque no existían diferencias en la presencia de manifestaciones radiológicas graves entre los individuos diagnosticados antes y después de dicha edad. En relación al genotipo solamente el genotipo L444P/L444P presentaba una incidencia significativamente menor de enfermedad ósea grave en relación a los demás genotipos; este hallazgo probablemente es más dependiente de la edad, dado que estos pacientes por término medio son más jóvenes y por lo tanto han tenido menos tiempo para desarrollar dichas manifestaciones (141). No parece existir una asociación entre el genotipo y la existencia de enfermedad ósea grave como demuestra el hecho de que poblaciones con frecuencias génicas distintas presentan porcentajes de afectación ósea semejante; concretamente en población japonesa donde la mutación L444P es la predominante Ida (206) comunicó recientemente un 57% de pacientes con enfermedad ósea grave, mientras en población española, donde existe una mayor heterogeneidad génica, según datos del REEG un 62,4 % presentaban afectación ósea (157).

La patogénesis de los cambios óseos en la enfermedad de Gaucher no se conoce completamente. Aunque las células de Gaucher no originan resorción ósea directamente, podrían estar iniciando los procesos de resorción ósea (205). Los estudios in vitro han demostrado que la adición de glucosilceramida a los macrófagos en medio de cultivo inducen secreción de interleucina-1, citocina que aumenta la actividad de los osteoclastos (207). Estudios recientes han revelado que los pacientes con enfermedad ósea presentan una disminución de linfocitos T CD8 en relación a los que no la presentan, este recuento tiene una correlación negativa significativa con los niveles de fosfatasa ácida tartrato resistente, siendo este un marcador reconocido de la actividad de los osteoclastos (208). Estudios histomorfométricos revelan una arquitectura anormal con pérdida de tejido conectivo trabecular, corticales trabeculares porosas y aumento del número de osteoclastos (209). Sin embargo, las concentraciones séricas de calcio, fósforo, proteína gamma-carboxiglutámica ácida, hormona paratiroidea y excreción urinaria de hidroxiprolina no se encuentran elevadas. Estos hallazgos sugieren que las áreas localizadas de resorción ósea explican mejor las lesiones óseas que una posible alteración del turn-over óseo en esta enfermedad. El compromiso vascular como consecuencia de la compresión extrínseca de los vasos por aumento de la presión

- INTRODUCCIÓN -

intraósea, así como la oclusión por trombosis y embolismo podrían también contribuir al origen de las lesiones óseas en la EG (205,210).

Entre los hallazgos clínicos más frecuentes de la enfermedad ósea destaca la osteopenia generalizada resultado del adelgazamiento de la cortical y pérdida de trabéculas lo que favorece la aparición de fracturas. También se puede producir osteoesclerosis asociada a infartos óseos por calcificación distrófica de la médula ósea necrótica. Los estudios de la masa ósea demuestran desmineralización generalizada en los pacientes con EG, dando lugar en ocasiones a la aparición de osteolisis y contribuyendo al desarrollo de fracturas patológicas (204). La osteonecrosis o necrosis avascular se produce por infarto crónico del hueso debido al compromiso de la microcirculación intraósea con isquemia localizada y obstrucción lo que genera inicialmente un cuadro doloroso agudo conocido como “crisis ósea”. Esta manifestación puede aparecer tanto en adultos como en niños, aunque es más frecuente en éstos. Un 30-40% de pacientes con EG ha presentado una crisis ósea a lo largo de su evolución; clínicamente se caracteriza por fiebre y dolor intenso, generalmente a nivel de un hueso largo, asociándose a isquemia de la médula ósea. Las crisis suelen aparecer con mayor frecuencia en la infancia, afectando cabeza femoral, humeral o extremo distal del fémur (211).

La gravedad de los cambios esqueléticos depende de la extensión e infiltración de la cavidad medular por las células de Gaucher (205). El acúmulo de células de Gaucher en la médula ósea conduce a diversas complicaciones: (1) osteoporosis difusa, (2) destrucción localizada, (3) necrosis isquémica y fracturas patológicas ().

Osteoporosis

El acúmulo de células de Gaucher en la cavidad medular conlleva atrofia y necrosis que provoca proliferación de tejido fibroso y esto a su vez resorción endostal (212). Estos cambios pueden producirse en el hueso cortical o trabecular y a su vez ser difusos o localizados. La reducción de la masa ósea aumenta el riesgo de fracturas patológicas (213).

Expansión medular

A medida que la enfermedad progresa el abundante número de células de Gaucher que reemplazan la médula ósea provocan expansión del contorno de los huesos tubulares. La

- INTRODUCCIÓN -

corteza se adelgaza, y la remodelación es inicialmente más manifiesta a nivel del fémur distal. Este fallo en la remodelación de la región metafisaria distal del fémur se conoce con el nombre de deformidad en matraz de Erlenmeyer y es indicativa de enfermedad activa en las fases de crecimiento (212). En raras ocasiones la extensión extraósea de los depósitos de células de Gaucher puede ocurrir tras destrucción de la cortical y simular la existencia de una lesión maligna (214,215).

Destrucción localizada

En determinados casos áreas osteolíticas múltiples, bien delimitadas pueden presentar la apariencia de panal y a medida que la enfermedad progresa, las lesiones líticas alternan con áreas escleróticas secundarias a calcificaciones distróficas de las masas necróticas de células de Gaucher. Alrededor de las zonas de necrosis tiene lugar neoformación ósea resultados de un aumento de la actividad en el recubrimiento perióstico como tiene lugar en la osteomielitis (205). La presencia de lesiones óseas en radiología convencional junto con aumento de los niveles de gammaglobulinas séricas obliga en ocasiones al diagnóstico diferencial con el mieloma múltiple.

Esclerosis y necrosis isquémica

Los episodios de dolor óseo agudo debido a necrosis isquémica pueden acontecer en cualquier etapa de la enfermedad. Puede afectar a la epífisis del fémur, cabeza humeral, rodilla y tobillo (en frecuencia decreciente). Pueden tener lugar en las diáfisis de huesos largos. Las crisis óseas se presentan habitualmente en la infancia o adolescencia, asociadas a fiebre, leucocitosis y aumento de la velocidad de sedimentación globular simulando en ocasiones una osteomielitis (210). La radiología simple en la fase aguda puede demostrar la existencia de una fina elevación perióstica (205).

Destrucción difusa

En su evolución la enfermedad ósea llega a una situación de destrucción difusa y como consecuencia el paciente puede presentar fracturas patológicas. Esto es más común en las extremidades inferiores, aunque ningún hueso está exento. Pequeños traumatismo sobre la columna vertebral pueden ocasionar colapso vertebral. La infiltración masiva de la médula ósea puede conducir a la compresión de los vasos sanguíneos ocasionando debilidad vertebral. Todos estos trastornos originan la aparición de vertebras planas de localización preferente toraco-lumbar, causadas por necrosis y fracturas por

- INTRODUCCIÓN -

compresión, con ensanchamiento secundario del espacio discal. Se han descrito tres tipos de fracturas por compresión (216): rectangular, central, y con acuñamiento anterior. En las fracturas por compresión central puede observarse bien una transición abrupta con periferia normal o un aspecto bicóncavo, visualizando herniación del núcleo pulposo discal en todos los casos (205). Se ha descrito un caso de compresión de médula ósea secundario a colapso de cuerpo vertebral (217).

Varias modalidades de imagen se han usado para caracterizar el patrón y gravedad de la afectación ósea en la EG tipo 1 incluyendo radiología simple, gammagrafía ósea, tomografía computarizada (TC), resonancia magnética (RM) y densitometría ósea (211, 218,219,220). Estas técnicas han demostrado la relación entre la patología y la infiltración medular pero no predicen necesariamente el curso clínico de la EG o permiten identificar de forma precoz a los individuos con riesgo de desarrollar complicación óseas. Quizás en este aspecto la RM presenta considerables ventajas.

Radiología simple

Las alteraciones osteoarticulares en la EG tipo 1 son muy variables, desde casos con afectación leve a otros con afectación grave. El comienzo suele presentarse en la infancia, aunque no es infrecuente que la primera manifestación de la enfermedad tenga lugar en la tercera o cuarta década de la vida (211). En algunas ocasiones los cambios óseos están presentes incluso antes que la esplenomegalia . La radiología convencional puede ser útil para establecer el patrón de afectación ósea en la EG. Sin embargo, es bastante insensible a la hora de detectar cambios medulares, así como determinar el grado de pérdida ósea (205).

Gammagrafía ósea

La gammagrafía ósea utilizando tecnecio difosfonato parece ser útil en la detección de infartos agudos (218). Inicialmente existe una disminución en la captación del radionúclido en la región afectada. Varias semanas después, dicha área aparece rodeada por un halo marginal con aumento de captación; y tras unos meses se normaliza (205,221). En un estudio, 15 pacientes evaluados mediante gammagrafía presentaban correlación entre los hallazgos encontrados y la radiología convencional. En todos los casos, la anomalía regional detectada en la gammagrafía se observaba también en la radiología simple (218).

Por otro lado, el tecnecio-99m sulfuro-coloide es un radionúclido en forma de trazador usado para valorar la distribución de las células del sistema reticuloendotelial en el hígado, bazo y médula ósea. La extensión de la infiltración medular puede aparecer normal con este método en estadios precoces. Cuando la enfermedad progresa hay acúmulo del trazador, junto con áreas de depósito no uniforme. En las formas más graves de la enfermedad, la extensa fibrosis, necrosis y disminución del flujo vascular, hace que el radionúclido permanezca en los vasos (218). Se ha demostrado la relación entre el patrón de distribución de médula ósea mediante gammagrafía y el grado de hepatoesplenomegalia (205).

Tomografía computarizada

La tomografía computarizada (TC) puede utilizarse en la valoración de la cortical ósea y en la valoración intramedular. La TC analiza la cortical ósea en caso de reacción perióstica secundaria a crisis ósea y también en estudio de extensión extraesquelética de depósito celular, en forma de masa con destrucción cortical, ayudando al diagnóstico diferencial con una neoformación ósea (218,222,223).

En el estudio medular la TC mide el coeficiente de atenuación de la médula grasa en pacientes afectados de EG. El aumento va correlacionado con la intensidad de la afectación (218). Usando QCT, o tomografía computarizada cuantitativa de alta resolución, se ha demostrado moderada disminución de trabéculas óseas y reducción significativa del contenido graso, obteniendo mediciones de la densidad cortical y trabecular, sumadas al contenido graso. Todo ello proporcionaría datos sobre la progresión de la infiltración medular en el curso de la enfermedad o la respuesta al tratamiento (224,225). Starer observó una mejoría ostensible en la los coeficientes de atenuación tras trasplante de médula ósea en un paciente con EG (226).

Densitometría ósea

La densitometría ósea es una técnica sensible, precisa y relativamente barata, que puede ser útil en la determinación de la afectación ósea en la EG, a diferencia de la radiología convencional que no es sensible para determinar el grado de pérdida ósea (205). La determinación de la densidad mineral ósea en 61 pacientes adultos afectados de EG tipo 1

- INTRODUCCIÓN -

mediante DEXA (dual energy X ray absorptimetry) reveló una densidad media significativamente menor que la esperada para su edad y sexo (213). En este estudio la gravedad de la osteopenia se correlacionaba significativamente con otros indicadores clínicos de intensidad de la enfermedad, incluyendo el genotipo N370S/84GG, esplenectomía anterior y hepatomegalia. Las determinaciones de densidad ósea también se correlacionaban con la gravedad de la enfermedad ósea (213,218).

Aunque la osteopenia es un hallazgo común en EG, la ausencia de uniformidad en los tipos de lesiones óseas hace que las determinaciones de densidad ósea no reflejen de forma global la gravedad de la afectación ósea. Además, no está claro si los cambios en el contenido graso en médula de pacientes en tratamiento con TES pueda ocultar los cambios en la masa ósea durante el seguimiento (205).

Resonancia magnética

En la afectación ósea de la EG existen dos fenómenos determinantes en las alteraciones visualizadas por resonancia magnética (RM) (211):

- Progresiva infiltración medular por células de Gaucher.
- Compromiso vascular debido a los fenómenos oclusivos secundarios a la colonización celular.

La infiltración medular provoca un reemplazamiento de la hiperseñal fisiológica medular, observando áreas hipointensas en T1 y T2, resultado de una modificación de los tiempos de relajación tisular. En conjunto aparece una disminución de señal de aspecto moteado (227).

En estadios precoces la infiltración de células de Gaucher comienza en las vértebras, y es visible solamente en ellas cuando la afectación es leve (228). Conforme va progresando la enfermedad, la infiltración se extiende del esqueleto axial al apendicular, afectando a la pelvis y extremidades inferiores, y con predominio proximal. Las epífisis aparecen preservadas salvo en los casos de afectación grave.

El patrón típico muestra una disminución de señal homogénea en T1 y T2 en los cuerpos vertebrales, y una disminución de señal no homogénea en segmentos

- INTRODUCCIÓN -

proximales de extremidades inferiores (219). Con la progresión de la enfermedad la pérdida de señal se volverá homogénea.

El compromiso vascular provoca infartos, osteonecrosis y pseudoosteomielitis u osteomielitis aséptica (211,229).

La osteonecrosis se debe a infartos crónicos provocados por oclusión arteriolar como consecuencia de una progresiva infiltración medular y episodios de vasoespasmo y trombosis. En las fases iniciales la médula necrótica es isointensa, y la transición entre el tejido normal y el necrótico aparece como una banda de baja señal en T1 y T2, que representa la reacción esclerótica con inicio de reosificación. En las fases posteriores la médula necrótica es hipointensa, apareciendo posteriormente la fractura cortical por colapso del hueso necrótico (227).

Antes de la aparición de la RM el 90% de las lesiones se diagnosticaban en fase tardía al visualizar una línea subcondral en radiología simple. En la actualidad la RM es la técnica de elección cuando la radiología simple es normal o existe un alto grado de sospecha (227).

Las imágenes RM reflejan los cambios histológicos (227):

En el estadio 1 la RM presenta una zona de edema hipointenso en T1 e hiperintenso en T2, mal definido análogo al que se observa en casos de osteoporosis transitoria. La radiología simple es normal.

En el estadio 2 se observa en T1 un área central hipo, iso o hiperintensa, rodeada externamente por la interfase reactiva que comporta un anillo de baja intensidad de señal. En T2 este anillo presenta una doble línea, la más interna hiperintensa y otra más externa hipointensa correspondiente a la formación osteoblástica. La doble línea está presente en el 80% de los pacientes y aunque no es patognomónica es altamente sugestiva de necrosis. En este estadio la radiología simple puede presentar una desmineralización inespecífica.

- INTRODUCCIÓN -

En el estadio 3 es cuando aparece la semiluna subcondral en radiología simple, que refleja una fractura subcondral. La RM muestra la fractura con hiperintensidad lineal en T2. Al progresar la enfermedad hacia estadio 4, la RM va mostrando los signos degenerativos asociados.

La semiología del infarto óseo en RM deriva de la esclerosis apreciable en radiología simple, observando vacío de señal o hipointensidad marcada en todas las secuencias, con la morfología irregular característica.

Un 30 a 40% de pacientes con EG presenta crisis óseas o episodios dolorosos consecuencia de infartos óseos agudos (216,230). En estos casos la médula ósea muestra un aumento de señal por edema en ponderación T2, similar al estadio precoz de necrosis, que contrasta con la médula adyacente. También puede existir una hemorragia subperióstica, originando una señal más intensa incluso que la grasa, debido al efecto paramagnético de los productos derivados de la hemoglobina (229). Los estudios de control muestran una recuperación de la señal fisiológica tras la crisis ósea. Aunque el proceso puede afectar a cualquier hueso, existe predominio de huesos largos, cabezas femorales y vértebras.

La repercusión de las fracturas vertebrales sobre el canal medular, espacios subaracnoideos y epidural se valora correctamente en RM mediante las diferentes orientaciones de corte (227).

La necesidad de detectar pequeñas variaciones en la intensidad de señal medular consecuencia de la infiltración celular, ha motivado el uso de QCSI (quantitative chemical shift imaging) (224,231), posibilitando la separación de la señal RM producida por la grasa y el agua. La fracción grasa se correlacionaba inversamente con el grado de infiltración medular. Esta técnica es bastante sensible para detectar cambios incipientes en la afectación medular, y la señal RM del agua se separa de la señal grasa mediante la adquisición de diferentes grupos de imágenes de columna lumbar. En un grupo de imágenes ambos están en fase, y en otro en oposición de fase. Tras análisis de datos, podrá obtenerse la fracción grasa. A pesar de no ser un método invasivo, resulta disponible en pocos centros y últimamente se cuestiona el grado de repercusión de los cambios detectados sobre el curso de la enfermedad (232).

4.2.9 Enfermedad pulmonar

Las manifestaciones pulmonares habituales de la EG son resultados de la compresión pulmonar por visceromegalias masivas o restricción torácica por cifoescoliosis secundaria a colapso vertebral. La enfermedad pulmonar restrictiva resultado de factores extrínsecos conlleva una reducción del volumen tidal y del flujo ventilatorio (179).

Las manifestaciones pulmonares intrínsecas de la EG han recibido poca atención hasta los últimos años. La EG puede afectar la vasculatura y ocasionar hipertensión arterial pulmonar. Por otro lado puede infiltrar el tejido pulmonar a nivel perivascular, peribronquial y regiones septales ocasionando fibrosis intersticial u ocupando los espacios alveolares lo que conduce a una consolidación pulmonar progresiva (179). Estas anomalías han sido comunicadas fundamentalmente en niños y adultos jóvenes con enfermedad severa en exámenes necrópsicos. Los cambios radiológicos incluyen opacificación reticular bilateral o patrón reticular – nodular (233).

En una serie de 95 pacientes con EG tipo 1, la función pulmonar se encontraba alterada en un 68%, mientras un 42% presentaban una reducción significativa de la capacidad de difusión. Un 18% de los pacientes estudiados presentaba alteraciones en la radiografía de tórax (234).

Las malformaciones vasculares pulmonares fueron reconocidas como una manifestación de la EG por primera vez en 1990 (235). Su manifestación directa es hipertensión pulmonar, no atribuible a otras causas bien definidas como enfermedad tromboembólica, vasculitis autoinmune e hipertensión portal. La hipertensión pulmonar se define como una presión media en arteria pulmonar mayor de 25 mmHg que conlleva un crecimiento de las arterias pulmonares e hipertrofia ventricular derecha. Los test de función pulmonar son normales salvo disminuciones discretas en la capacidad de difusión. La ecocardiografía pone de manifiesto la hipertrofia ventricular derecha y los análisis mediante doppler del flujo de insuficiencia tricuspídea es útil para estimar la presión en arteria pulmonar. El cateterismo del corazón derecho es útil para confirmar el diagnóstico. En fases terminales puede aparecer cor pulmonale. La muerte acontece habitualmente por inanición y fallo cardiaco derecho con taquiarritmias incontrolables (235).

- INTRODUCCIÓN -

La hipertensión pulmonar primaria ha sido descrita en hermanos con EG y en pacientes no tratados (236). Los estudios histopatológicos demuestran la presencia de células de Gaucher intracapilares, aunque en algún caso se ha encontrado un adelgazamiento de las capas de las arteriolas pulmonares en ausencia de células de Gaucher, lo que apoya la posible acción de un factor humoral; situación semejante a la encontrada en caso de hipertensión pulmonar secundaria a toxinas (179). Recientemente se han comunicado casos graves de hipertensión pulmonar en pacientes en tratamiento con alglucerasa, sugiriendo los autores una posible contaminación del enzima por productos placentarios como gonadotropina coriónica o componentes lipídicos tisulares (237), sin embargo la ausencia de estudios histológicos en estos casos impide confirmar la etiología tóxica.

Recientemente Elstein (238) presentó los resultados referente al estudio ecocardiográfico en 134 pacientes adultos afectados de EG tipo I, determinando la existencia de hipertensión pulmonar a partir de la medición del grado de insuficiencia tricuspídea. Un 7% de los pacientes presentaba un gradiente mayor de 30 mm Hg y en un porcentaje mayor existían hallazgos radiológicos sugestivos de hipertensión pulmonar ya que estos aparecían también en pacientes con gradientes entre 25-29 mm Hg. Esta frecuencia elevada obliga según los autores a realizar exámenes rutinarios ecocardiográficos tanto en pacientes no tratados como tratados, estos últimos dado que existe evidencia de progresión de la hipertensión pulmonar durante el TES (238,239). Además se sugiere la posibilidad de retirar el tratamiento si el gradiente progresa más allá de 30 mmHg y que hay que diferenciar entre la hipertensión pulmonar secundaria que puede responder al TES y la hipertensión pulmonar primaria que aparece en algunos pacientes tratados y que posiblemente pueda estar activada o agravada por el tratamiento (240). Sin embargo en otras series no se han documentado casos con progresión de la sintomatología debida a hipertensión pulmonar (241), posiblemente porque estos pacientes presenten comorbilidad que favorezca la predisposición a desarrollar hipertensión pulmonar. Aunque no se ha asociado la progresión de la hipertensión pulmonar con el régimen terapéutico utilizado en la serie de Elstein los pacientes recibieron en la mayoría de los casos dosis bajas, frente a otras series donde no se objetivó progresión y se utilizó el esquema de dosis elevadas – baja frecuencia (241). El pulmón, como el cerebro y posiblemente la médula ósea pueden representar zonas poco accesibles al enzima circulante. En estas situaciones un esquema de dosis

bajas puede no ser suficiente e impedir una concentración adecuada del mismo sobre todo si existen zonas de fibrosis y necrosis. Por ello otros autores están en desacuerdo con la posibilidad de retirar el tratamiento en pacientes sintomáticos en los que ciertamente el riesgo de progresión de la enfermedad aumentaría sin existir una evidencia definitiva de la relación entre el tratamiento y la hipertensión pulmonar (241). Recientemente Mistry (242) estudió la existencia de hipertensión pulmonar en un grupo de 122 pacientes comprobando que aquellos en TES presentaban una incidencia menor de hipertensión pulmonar respecto a aquellos no tratados. En este estudio la presión pulmonar se correlacionaba con la edad, sexo femenino y la existencia de esplenectomía. Este autor encontró una buena respuesta en los casos afectos de hipertensión pulmonar al optimizar el TES y asociarlo a la terapia con vasodilatadores.

En algunos pacientes se ha presentado un cuadro de hipoxia severa asociado a una amplia red de anastomosis intrapulmonares. Esto ocurre habitualmente en combinación con cirrosis establecida e hipertensión pulmonar (cianosis hepatógena o también conocido como síndrome hepatopulmonar). Característicamente estos pacientes presenta disnea y cianosis que disminuye en posición decúbito. Los pacientes presentan dedos en palillo de tambor y probablemente este fenómeno es resultado de la imposibilidad de metabolizar en el hígado un mediador de la vasodilatación como es el óxido nítrico (179).

En los casos con hipertensión pulmonar grave parece existir una respuesta favorable tras TES a dosis elevadas (243).

4.2.10 Manifestaciones oculares y cutáneas

Tanto las manifestaciones cutáneas como oculares más habituales son resultado del acúmulo de material glucolipídico, ya sea en dermis ocasionando hiperpigmentación cutánea y conjuntival o en esclerótica dando lugar a la aparición de pinguécula (179). En la reunión del Grupo europeo de EG (EWGGD) Wollstein (244) presentó los hallazgos oculares más habituales en 80 pacientes afectos de EG tipo I. Hasta un 70% presentaban pinguécula, bien de localización nasal o temporal. El estudio de motilidad ocular mostró anomalías en una proporción semejante a la población general. En un paciente se detectó opacidad corneal.

Existen además otras manifestaciones cutáneas que siendo características de la EG no son atribuibles al depósito del material glucolipídico constituyendo la expresión clínica de la implicación de otros órganos como sucede con las dilataciones vasculares malares, abdominales, cianosis hepatógena, eritema palmar propias de la afectación hepática o con los cuadros purpúricos petequiales expresión de situaciones de trombocitopenia (245).

4.2.11 Otras manifestaciones no habituales

Renales: Aunque en ocasiones se han identificado células de Gaucher en tejido renal en autopsias o biopsias renales dentro del mesangio o en los glomérulos, existe pocas referencias a manifestaciones clínicas renales en ausencia de amiloidosis. Al menos un caso de glomerulonefritis con proteinuria grave ha sido comunicado (246).

Cardiacas: Se han comunicado casos de pacientes que han presentado episodios de pericarditis, que pueden ser recurrentes y en ocasiones se asocian con calcificaciones pericárdicas y constricción (247).

La calcificación de válvulas cardiacas que presentan típicamente los individuos homocigotos para la mutación D409H será tratada dentro del apartado de formas neuronopáticas al tratarse de pacientes clasificados clásicamente como tipo 3c.

Enfermedad de Parkinson: Diversos casos comunicados en Francia y en Israel hablan de la asociación de Parkinson con EG (248). En un caso la enfermedad de Parkinson se acompañaba de afectación cerebelosa y demencia. La edad media de aparición de la enfermedad de Parkinson en estos pacientes, que lleva habitualmente un curso tórpido, se sitúa entre la cuarta y sexta década de la vida. En 6 pacientes en Israel se presentó a los 47.5 años, significativamente antes del inicio de dicha enfermedad en población israelí (61 años). No está clara la posible asociación entre EG y enfermedad de Parkinson, pero en los casos comunicados existe en general una mayor gravedad y una resistencia significativa a la terapia convencional.

Colitis: Se ha comunicado el caso de un paciente con hemorragia colónica profusa asociada a EG (249). El examen histológico reveló infiltración difusa de la mucosa por

células de Gaucher lo que sugería que la inflamación local era la causa del sangrado más que por una tendencia al sangrado generalizada.

Enfermedades linfoproliferativas: La asociación entre EG y enfermedades linfoproliferativas es otro tema en controversia (250); el acúmulo anómalo de glucocerebrosido en el sistema mononuclear macrofágico produce activación del sistema reticuloendotelial constituyendo un estímulo crónico y constante para la línea linfoide B. Este estímulo podría ser el responsable parcialmente y junto al desequilibrio en el metabolismo lipídico de la aparición de gammapatías policlonales detectadas con gran frecuencia en estos pacientes. En un análisis reciente realizado entre los pacientes españoles afectos de EG, se observa que el 71.4% presenta aumento policlonal de la fracción gammaglobulínica sérica (251); otros autores refieren que el 85% de los pacientes afectos de EG de menos de 50 años, presentan componentes oligoclonales séricos (252). Como justificación a este hecho hay que considerar que el monocito-macrófago es una célula muy comprometida en el funcionamiento del sistema inmune humano, actuando directamente como elemento efector de la fagocitosis y como presentadora de antígenos para los elementos linfoides de la línea B. Se especula en este sentido si la constante estimulación del sistema inmune que sufre el paciente con EG, condicionaría la eventual aparición de gammapatías monoclonales y síndromes linfoproliferativos incluido el mieloma múltiple (215). En el Registro de EG de la Universidad de Pittsburg, probablemente uno de los más importantes del mundo, y en el que se recogen 463 pacientes con EG tipo 1, se refiere como causa de muerte en 13 pacientes (2.8%) un proceso linfoproliferativo de estirpe B (mieloma múltiple, 5; linfoma no Hodgkin, 4; y leucemia linfática crónica, 3) (253). También se ha descrito la presencia de amiloidosis como consecuencia del estímulo constante de la línea B (254).

Tiroideas: Mengel (255) comunicó dos casos de tiroiditis autoinmune en pacientes afectos de EG tipo I, sugiriendo que la disregulación inmune propia de la EG podría ser el origen de la tiroiditis en estos pacientes.

4.2.12 Enfermedad de Gaucher y embarazo

Durante bastante tiempo el embarazo y la EG eran considerados incompatibles y no era recomendado para una mujer afectada de EG quedarse embarazada. A pesar de que esta actitud ha cambiado en los últimos años, diversos estudios muestran como las

complicaciones ginecológicas y obstétricas existen y han de tenerse en cuenta (256,257).

El embarazo en la EG tiene varios riesgos incluyendo un grado mayor de anemia y trombocitopenia, que pueden aumentar la hemorragia postparto, aumento significativo de las organomegalias, empeoramiento de las manifestaciones esqueléticas y un aumento del riesgo de aborto (256,257,258). Sin embargo opiniones existentes en relación a una incidencia mayor de esterilidad y muertes neonatales no ha sido comunicado (256,258).

En la serie de Gramovsky-Grisaru (256) en un 24.5% de las mujeres embarazadas tenía lugar un aborto espontáneo en el primer trimestre de la gestación. En ocasiones el diagnóstico de la EG tiene lugar durante la gestación al ponerse de manifiesto la sintomatología.

Recientemente se ha comunicado los beneficios del TES en las mujeres embarazadas (259). Tanto la alglucerasa como la imiglucerasa están clasificadas por la Food and Drug Administration en la categoría C de agentes terapéuticos al carecer de estudios en animales en periodo de reproducción, que no permiten descartar un eventual efecto teratogénico sobre el feto. Sin embargo, en el escaso número de pacientes en las que ha coincidido TES y gestación, no se ha descrito hasta la fecha ningún tipo de complicación o efecto adverso en la madre o en el feto (260).

No se ha demostrado influencia de los genotipos en las complicaciones ginecológicas u obstétricas (256). Además parámetros como TNF- α , quitotriosidasa, β -hexosaminidasa no tienen un valor predictivo en relación al desarrollo de complicaciones (261).

4.2.13 Enfermedad de Gaucher. Crecimiento y desarrollo.

En el niño existen una serie de manifestaciones generales que hablan también de la actividad de la enfermedad. Entre ellas cabe destacar el retraso de crecimiento, malnutrición, en ocasiones alteraciones en el desarrollo psicomotor, retraso en la maduración sexual y fracaso escolar. De todos ellos, el retraso de crecimiento parece ser de gran valor a la hora de determinar la gravedad así como el grado de progresión de la EG en los niños (204,245). Prácticamente la mitad de los niños con EG tipo I presenta evidencia antropométrica de retraso de crecimiento. Incluso un porcentaje elevado de

pacientes en la serie de Kaplan (22%) presentan un patrón de crecimiento normal, pero pobre en relación a la talla diana familiar (262). Recientemente Kauli (263) comprobó que dicho retraso de crecimiento acontece fundamentalmente entre los 3 y 7 años (el SDS-talla desciende de 0.34 entre los 0-3 años a -1.93 entre los 7-10 años). El retraso de crecimiento es paralelo a la gravedad de la enfermedad medida por otros parámetros (245). En ocasiones el retraso de crecimiento es la única manifestación de la enfermedad en el niño (245). Se ha demostrado que el TES puede normalizar el crecimiento si bien no existe todavía suficiente evidencia en la literatura (262). Por otro lado el origen del retraso de crecimiento sigue sin estar suficientemente aclarado, si bien Kaplan encontró una correlación significativa entre el tamaño hepático y el retraso de crecimiento (262); lo que podría suponer que la disfunción hepática pudiera estar influyendo en el pobre crecimiento que presentan estos pacientes.

Asociado al retraso de crecimiento los niños que desarrollan la EG en los primeros años de vida presenta con frecuencia una pubertad retrasada; hasta un 59.6% en la serie de Kauli (263); si bien en todos los casos existe finalmente una maduración sexual completa. El TES también parece normalizar el inicio de la pubertad en estos pacientes.

4.2.14 Historia natural de la enfermedad de Gaucher tipo I y pronóstico

La EG tipo I presenta una extraordinaria variabilidad que impide conocer la evolución natural en cada paciente. Sabemos que el efecto de diversos tratamientos (TES, esplenectomía, tratamientos ortopédicos,...) influyen claramente en el proceso y pueden intervenir en su evolución. Sin embargo, la ausencia de medios rigurosos para cuantificar su influencia en la evolución a largo plazo de los pacientes, hace que los efectos de estas intervenciones en el curso y progresión de la enfermedad no estén del todo aclarados (179).

Aunque algunos pacientes portadores de las mismas mutaciones presentan un curso clínico semejante, otros, incluso dentro de la misma familia y por lo tanto con el mismo genotipo, pueden mostrar grandes variaciones en la manifestaciones de la enfermedad. Es evidente que la expresión clínica de la enfermedad (y por lo tanto el pronóstico) no puede ser completamente predecida exclusivamente a partir del análisis de las mutaciones (264). Sin embargo como ya se ha señalado si podemos hacer algunas generalizaciones. La presencia de al menos una copia de la mutación N370S, se asocia

- INTRODUCCIÓN -

invariablemente con una EG tipo I y excluye la aparición de clínica neurológica en su evolución (265). Esto puede explicarse probablemente por la existencia de una actividad enzimática residual. En los pacientes homocigotos para la mutación N370S se observa una gran variación en su expresión clínica: desde la situación más habitual presentada en individuos con prácticamente ausencia de signos y síntomas de la enfermedad hasta otros con afectación esquelética moderada o severa y esplenomegalia masiva (179).

La presencia de la mutación L444P en homocigosis en un paciente sin afectación neurológica ha sido descrita en la literatura, sobre todo en población japonesa (143,178,179); sin embargo un importante número de estos pacientes están desarrollando sintomatología neurológica en su evolución (151).

Aunque los medios para cuantificar la afectación multisistémica de la EG son imperfectos, el desarrollo de un score de gravedad por Zimran (SSI) (169,195) ha permitido establecer correlaciones entre la expresión de la enfermedad y otras variables.

Existen dos índices el “*Severity score index age related*” (SSIA) (169) (Tabla 12) y el “*Severity score index*” (SSI) (195), que asignan valor numérico de puntuación a la edad de presentación de los primeros signos y síntomas (SSIA), la gravedad de las citopenias, el grado de hepatoesplenomegalia, la presencia y edad de la esplenectomía, la existencia y grado de afectación ósea y la afectación de otros órganos. El SSIA enfatiza el hecho de que el comienzo temprano de las visceromegalias es un indicador de gravedad de la enfermedad y mal pronóstico. Según la puntuación alcanzada, se establecen tres grados de intensidad de la enfermedad: leve (0-10 puntos), moderada (11-25) y grave (>26). Sin embargo parece necesario mejorar estos índices de cara a determinar la posible historia natural de la enfermedad de una forma más precisa. Por ejemplo la presencia de retraso de crecimiento en las formas no neuropáticas parece asociarse con la gravedad de la enfermedad y sin embargo no está recogido en estos índices (179).

Otro problema importante es lo difícil que resulta determinar los distintos aspectos de la enfermedad esquelética; en este sentido en la reunión del EWGGD Roca (266) propone la utilización de un score combinado SSI-MRI (Resonancia magnética) que ofrece una mayor sensibilidad y especificidad que el clásico SSI para definir el pronóstico sobre todo en referencia a la afectación ósea. En dicho score se añaden criterios objetivos

- INTRODUCCIÓN -

sobre la afectación esquelética teniendo en cuenta los distintos patrones de afectación ósea (normal, infiltración no homogénea reticular, moteada o difusa y infiltración homogénea). En la serie analizada la aplicación del score de Zimran clasifica al 33.33% de los pacientes en los grupos de afectación leve y moderada, mientras que el nuevo score incluye al 88.88% de los pacientes en los grupos de afectación moderada o grave.

Tabla 12. Severity score index age adjusted (SSIA)

Datos analizados	Puntuación	Datos analizados	Puntuación
Citopenia		Clínica de hepatopatía	4
No esplenectomizados	1	Afectación SNC	20
Esplenectomizados:		Afectación de otros órganos	4
Anemia	1	Afectación ósea	
Leucopenia	1	Objetiva	
Trombocitopenia	1	No signos ni síntomas	0
Esplenomegalia*		Signos radiológicos	1
No	0	Subjetiva	
Leve (por encima ombligo)	1	Ausencia de dolor	0
Moderada (ombligo-pelvis)	2	Dolor ocasional	2
Masiva (fosa iliaca)	3	Dolor crónico	3
Esplenectomía	3	Fracturas	
Hepatomegalia		Postraumáticas	1
No	0	Patológicas	5
Leve	1	Necrosis aséptica	5
Moderada	2	Edad al diagnóstico (años)	
Masiva	3	< 50	0
Funcionalismo hepático		26-50	1
Todas normales	0	11-25	2
Alguna alterada	1	6-10	3
Todas alteradas	2	1-5	4
		<1	5

4.3 Enfermedad de Gaucher tipo 2 y 3

Como se ha señalado la clasificación de la EG obedece a criterios estrictamente clínicos. Los tipos 2 y 3, o formas neuronopáticas presentan de forma constante afectación neurológica en contraposición al tipo 1.

4.3.1 Frecuencia

la prevalencia de las formas neuropáticas es sensiblemente menor a la EG tipo 1; en el caso de la EG tipo 2 se ha estimado frecuencias de menos de 1/100000 nacidos vivos y esto es probablemente debido a la gran incidencia de abortos que ocasiona esta forma de presentación, así como la poca viabilidad de los recién nacidos que presentan una alta incidencia de complicaciones postparto (31). En relación a la EG tipo 3 se ha estimado una frecuencia de EG tipo 3 que varía entre 1/50.000 y 1/100000 nacidos vivos (40). El prototipo de esta enfermedad es la forma Norrbottnian, nombre de la comunidad sueca donde se da particularmente esta forma de presentación, aunque es de distribución panétnica. Según datos del Registro Internacional (141) menos del 1% de los pacientes presentaban EG tipo 2 y un 5% reunían criterios de EG tipo 3.

4.3.2 Etiología y fisiopatología

Como ya se ha señalado no existe en todos los casos una correlación constante entre el genotipo y el fenotipo de los individuos afectados. Algunas de ellas parecen específicas de un determinado patrón clínico, pero otras parecen dar lugar a formas clínicas distintas en función de la mutación con la que se combinan en doble heterocigosidad, del grupo étnico en que se presentan, o incluso del individuo afecto dentro de una misma familia (267). En los tipos 2 y 3 de la EG, las mutaciones identificadas hasta el momento actual pueden agruparse de un modo general, en cuatro grupos diferentes, en función de su relación con el fenotipo de los pacientes (268,269,270).

Grupo I. Mutación L444P que en homocigosidad es característica de los tipos 2 y 3. Sin embargo en los últimos años han surgido dudas en relación a la correlación genotipo-fenotipo de esta mutación. En primer lugar un número importante de casos homocigotos para la mutación y afectados de una forma tipo 2 de la enfermedad descritos en la literatura posiblemente obedecen a la existencia de un alelo recombinante y no homocigosis de la mutación L444P (143). Además y como se ha comunicado en la literatura en diversos casos existen individuos homocigotos para la L444P que no

- INTRODUCCIÓN -

presentan sintomatología neurológica (143, 178, 179); sin embargo en muchos de estos casos se trata de pacientes de escasa edad y como se ha visto en la serie más amplia de individuos homocigotos para esta mutación en su evolución la mayoría están desarrollando clínica neurológica (151).

Grupo II. Mutación D409H, que en homocigosis parece condicionar la presencia de una forma neuronopática peculiar de la que se tratará más adelante. En doble heterocigosis se ha descrito en pacientes con las formas 1,2 y 3.

Grupo III. Mutaciones diversas, tales como 84GG, IVS-2+1, RecTL, RecNcil, R463C, I604A, D55, Y313H, G377S, G195W, etc., que no parecen condicionar ninguna forma clínica y que, en diversas combinaciones, se han encontrado en pacientes con formas neuronopáticas y con formas no neuronopáticas. Sin embargo dentro de este grupo cabría separar a las recombinaciones, dado que para presentar una EG tipo 2 se cree que puede ser preciso un alelo con actividad nula (recombinaciones) y que muchos de los casos descritos como EG tipo 2 y homocigotos para la mutación L444P eran realmente falsos homocigotos para dicha mutación (143) y que posiblemente otras mutaciones derivadas del pseudogen puedan estar presentes (187).

Grupo IV. Mutación N370S que no se ha descrito por el momento en los tipos 2 y 3, y cuya presencia parece asegurar la indemnidad neurológica de los individuos afectados.

En el apartado de correlación genotipo-fenotipo se analizan las posibles combinaciones (Tabla 6) en base a la clasificación clásica en “alelos nulos” (mutaciones que impiden que se sintetice el enzima) (Tabla 7), “alelos graves” (se encuentran en pacientes afectados de formas neuronopáticas) (Tabla 8) y “alelos leves” (encontradas en pacientes con EG tipo 1 bien en homocigosis o en heterocigosis con otras mutaciones que se conocen como leves) (Tabla 9).

Desde un punto de vista fisiopatológico y a diferencia de las formas tipo 1 donde el acúmulo cerebral se limita a los espacios de Virchow-Robin, este tiene lugar en distintas estructuras cerebrales. En este sentido se han encontrado células de Gaucher en los espacios de Virchow-Robin, cortex, sustancia blanca, tálamo y áreas subependimarias de tronco y médula; presencia de células de Gaucher en parénquima de corteza cerebral

y lóbulos occipitales; acúmulo difuso de glucosilceramida y especialmente glucosilesfingosina almacenada en microglia del tallo cerebral y neuronas de médula espinal; aumento de flujo cerebral con disminución de la fracción del extracción de oxígeno cerebral; y aumento de calcio intracelular en oligodendroglia. Además la composición de los ácidos grasos es compatible con un origen neuronal (29,271,272). Estas diferencias en la distribución del acúmulo lipídico, casi seguro que está relacionado con el tipo de mutación responsable del déficit enzimático. Es probable que determinadas mutaciones condicionen la presencia de una actividad enzimática residual suficiente para la hidrólisis de los gangliósidos cerebrales, quedando entonces el sistema nervioso central libre de síntomas, y dando lugar a las formas no neuronopáticas de la enfermedad. Por el contrario, la falta casi total de actividad enzimática sería la responsable del acúmulo de glucosilceramida en macrófagos y en neuronas del cerebro y, por tanto, de la aparición de las formas neuronopáticas de la enfermedad (268,273). Recientemente Sakura (274) ha comprobado como la presencia de células de Gaucher en líquido cefalorraquídeo se asocia con afectación neurológica. Además la presencia de células de Gaucher, ya presente en fases de escasa afectación, se eleva sensiblemente cuando la sintomatología se agrava.

Recientemente se ha demostrado como el acúmulo de glucosilesfingosina en los pacientes afectos de EG tipo 2 tiene lugar intraútero; lo que posiblemente indica que el tratamiento iniciado tras el nacimiento es ya insuficiente para prevenir las secuelas del daño neurológico que empieza en etapas precoces de la gestación (275).

En la EG tipo 2 se ha comprobado en la piel constantes alteraciones bioquímicas (aumento del cociente glucosilceramida / ceramida) y anomalías estructurales (hiperqueratosis, hiperplasia epidérmica y paraqueratosis con ausencia de capa granular) que justifican la incompetencia funcional de la barrera cutánea y la manifestaciones dermatológicas de los pacientes (276,277).

4.3.3 Enfermedad de Gaucher tipo 2 (neuronopática aguda)

La EG tipo 2, infrecuente y sin dominio étnico, es una forma neuronopática aguda de la enfermedad que se presenta en la primera infancia. Existe cierta heterogeneidad en este grupo de pacientes, pero no como en el tipo 3. Además de los típicos signos sistémicos de EG, estos pacientes desarrollan un síndrome neurológico característico con disfagia,

- INTRODUCCIÓN -

hiperextensión cervical persistente, estrabismo, trismus, espasticidad generalizada y regresión psicomotora. En fases avanzadas pueden presentar laringoespasmo y episodios apnéicos. Algunos pacientes desarrollan mioclonias y convulsiones generalizadas tónico-clónicas. La muerte suele acontecer a los dos años de vida como resultado de la disfunción cerebral progresiva (278). Algunos pacientes presentan un comienzo algo más tardío y una evolución más lenta pero con los mismos síntomas y pronóstico (29).

Desde que se comunicó la asociación entre ictiosis y enfermedad de Gaucher, los estudios murinos y humanos realizados confirman que este fenotipo es parte del espectro clínico del tipo 2 de la enfermedad. Sin embargo, todavía es difícil establecer la frecuencia de esta rara forma de EG. Existen más de 10 casos publicados enfermedad de Gaucher neonatal con ictiosis (188,276,277,279,280-285). Aunque el déficit epidérmico de glucocerebrosidasa debe contribuir al desarrollo de la ictiosis, no está claro porque sólo algunos niños con EG tipo 2 desarrollan el fenotipo de collodion baby. Los estudios histológicos y ultraestructurales de la piel de los pacientes que no presentan afectación dermatológica revela que también presentan las anomalías epidérmicas (277). De hecho los estudios de piel pueden permitir distinguir pacientes con EG tipo 2 de aquellos con EG tipo 1 y 3 antes del desarrollo de signos neurológicos graves.

Se ha especulado que la descamación cutánea alterada observada en pacientes con ictiosis congénita podría ser resultado de anomalías en la cohesión intercelular (277).

De todos los casos comunicados con esta sintomatología solamente un genotipo se ha repetido en varios casos (286,287); se trata de pacientes homocigotos para un alelo recombinante (RecNciI) que incluye una secuencia del pseudogen y que se ha encontrado con elevada frecuencia en poblaciones de origen hispano (153). En todos ellos existía consanguinidad familiar. En relación a las demás mutaciones encontradas se puede señalar que no existen genotipos específicos para este fenotipo; si bien se han encontrado mutaciones presentes en formas graves de EG tipo 2 previamente descritas (R131C, R120W, S196P) (286).

Posiblemente la EG tipo 2 con ictiosis congénita o también conocida como forma letal perinatal sea la más frecuente dentro del espectro de EG tipo 2, dado que su frecuencia

real puede encontrarse subestimada debido a que muchos casos son diagnosticados de collodion baby o hydrops de origen desconocido (285).

Recientemente Finn (287) ha presentado un caso de un paciente de origen hispano con una forma perinatal letal con membranas de collodion que asociaba una artrogriposis severa. El paciente presentaba una actividad de β -glucocerebrosidasa indetectable y era homocigoto para el alelo recombinante, RecNciI. En diversos casos comunicados se ha mencionado la existencia de contracturas articulares atribuidas a la dermatopatía restrictiva (283). Sin embargo en este caso la piel estaba irregularmente adelgazada pero no era constrictiva. El examen del sistema nervioso central reveló la existencia de pérdida neuronal extensa, gliosis y desmielinización. Las astas anteriores de la médula espinal presentaba una escasa población neuronal; lo que hace pensar que el mecanismo de la artrogriposis en este paciente sea semejante al que acontece en la enfermedad de Werdnig-Hoffmann, existiendo un proceso de apoptosis neuronal a este nivel (287).

Por último se han documentado dos hermanos con una evolución fatal en los primeros meses de la vida con afectación visceral grave con hepatoesplenomegalia e hiperesplenismo sin existir alteraciones neurológicas ni cutáneas (288). Estos pacientes eran homocigotos para la mutación L444P y por su evolución deben ser considerados como otra forma de presentación de la forma perinatal letal de la EG.

4.3.4 Enfermedad de Gaucher tipo 3 (neuronopática subaguda o crónica)

La EG tipo 3 es una forma neuronopática crónica progresiva que se presenta tanto en la infancia, adolescencia o en el adulto. Las características clínicas de este fenotipo son más variables que las observadas en la EG tipo 2 (278).

Se han realizado intentos para distinguir diferentes subtipos dentro de la EG tipo 3 (184): algunos pacientes presentan afectación neuronopática progresiva con comienzo en la adolescencia (Tipo 3a); mientras otros presentan hepatoesplenomegalia muy importante y enfermedad ósea y como afectación neurológica exclusiva apraxia oculomotora progresiva (Tipo 3b). Las características clínicas asociadas con la homocigosidad para la mutación D409H han sido clasificadas recientemente como EG tipo 3c.

- INTRODUCCIÓN -

El fenotipo más característico dentro de la EG tipo 3 es el que presentan un importante número de casos caracterizado por epilepsia mioclónica progresiva junto con oftalmoplejia supranuclear horizontal. En ocasiones con la evolución de la enfermedad puede aparecer demencia, ataxia y espasticidad (278). Sin embargo se han descrito manifestaciones muy heterogéneas en pacientes clasificados como tipo 3. Recientemente se han comunicado casos de hidrocefalia comunicante en pacientes afectados de EG tipo 3 que presentaban en heterocigosis la mutación D409H (289,290).

En los pacientes Norrbottnian del norte de Suecia la enfermedad se inicia típicamente en la infancia con afectación sistémica grave y afectación neurológica heterogénea lentamente progresiva. Lo más frecuente es la oftalmoplejia supranuclear horizontal y demencia que avanza de forma lenta. Otras manifestaciones incluyen estrabismo convergente, infiltrados retinianos, ataxia, espasticidad leve en las extremidades inferiores y epilepsia (mioclónica o convulsiones parciales complejas). La ataxia y la espasticidad se observan en fases muy avanzadas (278). Algunos pacientes presentan un curso rápido con fallecimiento a los 2-3 años de vida, si bien es más fácil encontrar pacientes con un curso mucho más lento que alcanzan la cuarta década de la vida.

Las anomalías de la motricidad ocular es la manifestación clínica más frecuente en estos pacientes; sin embargo en la mayoría de los casos sólo se determinó su existencia mediante examen clínico y como recientes estudios han demostrado en fases precoces se pueden detectar anomalías en la motricidad ocular mediante técnicas de electrooculografía (291).

Dentro de los posibles trastornos epilépticos encontrados en pacientes con EG tipo 3, la epilepsia mioclónica es la más frecuente. Si bien no se conoce su patogénesis en estos pacientes se ha descrito degeneraciones selectivas a nivel del núcleo dentado cerebeloso, así como en el tracto dentorubrotalámico (292).

En la epilepsia mioclónica progresiva se ha descrito aumento de los potenciales evocados somatosensoriales, sin embargo este hallazgo se presenta en otros pacientes con afectación tipo 3 sin epilepsia mioclónica. Se ha encontrado una correlación significativa con el grado de déficit cognitivo (293).

- INTRODUCCIÓN -

En los últimos años se ha descrito el subtipo 3c (294). Clínicamente estos pacientes presentan apraxia oculomotora en la temprana infancia y calcificación progresiva de las válvulas mitral, aórtica y de la aorta ascendente que se manifiesta ya en la adolescencia, dando lugar posteriormente a estenosis valvular que en muchos casos requiere cirugía. Estos pacientes presentan típicamente el genotipo D409H/D409H. La apraxia oculomotora congénita se caracteriza por afectación de los movimientos horizontales tanto voluntarios como inducidos ópticamente con preservación de la mirada vertical voluntaria. Este fenómeno se cree tiene su origen en la afectación del desarrollo del tracto neural responsable de los movimientos oculares con disfunción en el área 8 y los tractos frontomesencefálicos (295). La afectación cardíaca es infrecuente en la EG y prácticamente se puede considerar exclusiva del tipo 3c (160,296). La calcificación puede ser secundaria a episodios previos de valvulitis iniciados por depósito de células de Gaucher o liberación de citocinas. Este genotipo ha sido descrito inicialmente en familias árabes y españolas (160,296), si bien en la actualidad existen casos en otras poblaciones (294). En los casos descritos en España la hepatoesplenomegalia y la epilepsia mioclónica fueron las manifestaciones detectadas de la enfermedad, mientras que las manifestaciones cardíacas resultaron en su evolución fatales al igual que en los pacientes de familia árabe descritos (296).

Esta mutación parece asociarse de forma frecuente, incluso en heterozigosis con otras mutaciones graves, con anomalías en la oculomotricidad (297). Posiblemente este genotipo es el que presenta una más clara correlación genotipo-fenotipo en la EG.

Por último hay que clasificar dentro de este grupo los casos descritos de EG por déficit de sap-C. Concretamente el caso de origen español debutó a los 8 años de con episodios transitorios de pérdida de conciencia, mioclonias y convulsiones generalizadas resistentes a todas las terapias antiepilépticas. Posteriormente desarrolló oftalmoplejia horizontal progresiva, así como signos cerebelosos y piramidales, falleciendo a la edad de 15 años (123).

5. ASPECTOS METABÓLICOS

En la EG existen cambios en las concentraciones plasmáticas de determinados lípidos y proteínas, teniendo algunos de ellos un papel importante en la monitorización de los pacientes.

5.1 Alteraciones lipídicas

5.1.1 Glucosilceramida

Diversos estudios han revelado que las concentraciones plasmáticas de glucosilceramida están significativamente aumentadas en los pacientes con EG (57,61,298). El incremento medio se cifra aproximadamente en dos veces los valores normales, siendo mucho menor que en los tejidos. Existen casos en los que no se evidencian alteraciones en los niveles plasmáticos de glucosilceramida, sin embargo las elevaciones más pronunciadas se encuentran en pacientes afectados de las formas neuronopáticas más graves (299). Algunos autores prefieren la determinación de glucosilceramida en eritrocitos dadas las dificultades técnicas en su determinación en plasma (300). Los niveles en plasma y eritrocitos se encuentran elevados en igual medida. Aunque es probable que la elevación en plasma se deba a la presencia de células de Gaucher en los tejidos y órganos no está claro hasta que punto es un reflejo del total de células de Gaucher en el organismo o por el contrario se debe al acúmulo de dichas células en determinadas localizaciones (299). A pesar de estas limitaciones la monitorización de los niveles plasmáticos o eritrocitarios puede ser interesante durante el TES para evaluar los efectos de la intervención ya que se ha comunicado descensos significativos en dichos niveles en pacientes con diversos fenotipos en respuesta a la terapia sustitutiva (22,301).

5.1.2 Colesterol y lipoproteínas

La EG tipo 1 se ha asociado con un descenso en la concentración plasmática de LDL colesterol (LDL-C) y HDL colesterol (HDL-C) así como de las apolipoproteínas A-I y B (302). Más aún, la magnitud del descenso de las fracciones lipoproteicas podría estar relacionado con la gravedad de la enfermedad. Los estudios metabólicos han demostrado que estos descensos se deben al aumento del catabolismo de las apolipoproteínas A-I y B en HDL y LDL, respectivamente (303). Por el contrario la apolipoproteína E se encuentra elevada en pacientes con EG tipo 1, normalizándose tras esplenectomía. Además de poseer un menor número de partículas LDL y HDL, estas lipoproteínas tienen un contenido reducido de colesterol.

Las concentraciones de HDL-C en pacientes con EG tipo 1 se encuentran en el rango de la hipoalfalipoproteinemia familiar; la cual está identificada como factor de riesgo de

enfermedad coronaria (304). A pesar de tener disminuido el colesterol total (CT), la concentración disminuida de la fracción HDL-C hace que su índice aterogénico Colesterol total/HDL-C se encuentre elevado (305). Teniendo en cuenta que los sujetos con EG presentan unas concentraciones muy reducidas de HDL-C y apoproteína A-I, la retirada del material lipídico de los tejidos periféricos tendría que ser responsabilidad de la fracción HDL rica en apoproteína E, γ -LpE. Por tanto, es posible que el riesgo cardiovascular en sujetos con EG pueda estar asociado con la variabilidad interindividual de γ -LpE (305).

El TES produce una elevación significativa en las concentraciones de HDL-C y apoproteína A-I, sin modificar las concentraciones de LDL-C y apoproteína B. Los niveles de apoproteína E se ven sensiblemente reducidos posiblemente como consecuencia de la menor activación de macrófagos (306).

Otro hallazgo reciente es el hecho de que los individuos portadores de una mutación del gen de la glucocerebrosidasa y por tanto asintomáticos para la enfermedad presentan niveles disminuidos de la fracción HDL-C. Este hecho supone que teniendo en cuenta la frecuencia variable de portadores en diferentes poblaciones (1-7%) (34,35,307,308), las mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa podrían originar hipoalfalipoproteinemia familiar al 2% de la población general convirtiéndose en una de las causas genéticas más importantes del déficit de HDL-C (309).

5.2 Alteraciones en proteínas y enzimas plasmáticas

5.2.1 Transcobalamina

Gilbert (310) observó como la mayoría de los pacientes con EG presentaban niveles elevados de Transcobalamina II circulante no asociados a niveles elevados de vitamina B12; incluso recientemente Abrahamov (311) ha encontrado una alta incidencia de déficit de vitamina B12 en pacientes con EG de origen ashkenazi. No se ha encontrado ninguna correlación entre los niveles elevados de transcobalamina y marcadores clínicos de la enfermedad por lo que no se ha utilizado como marcador.

5.2.2 Ferritina

Otra anomalía frecuentemente encontrada en los pacientes con EG son los niveles elevados de ferritina (195,312). Se ha sugerido que los niveles elevados de ferritina

tienen su origen en su liberación por las células de Gaucher o sus precursores los monocitos (313). Sin embargo tampoco está claro el valor de la ferritina como marcador de las células de Gaucher. Los niveles elevados de hierro y ferritina no parecen tener ninguna relevancia fisiológica aunque se ha especulado con la posibilidad de que los niveles elevados de ferritina pudieran interferir con los linfocitos T y de esta manera contribuir al incremento de ciertas enfermedades malignas presentes en pacientes con EG (313). Se ha confirmado la reducción de los niveles de ferritina tras TES (299).

5.2.3 Inmunoglobulinas

La EG se asocia con un incremento en la prevalencia de gammapatías monoclonales y oligoclonales (314). Con frecuencia se encuentran en estos pacientes hipergammaglobulinemia policlonal. Se ha especulado con la posibilidad que determinadas citocinas liberadas por los macrófagos activados puedan ser el origen de estos trastornos (315). En este sentido es comprensible que en la EG exista una incidencia aumentada de enfermedades malignas de estirpe B (250) y mieloma múltiple (215).

5.2.4 Citocinas y Factor estimulante de colonias macrofágicas (M-CSF)

Los macrófagos juegan un papel importante en la fisiología y patogénesis de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. El papel clave del macrófago en el origen de la EG ha llevado a múltiples especulaciones en relación a la posible liberación de citocinas proinflamatorias (29).

El primer estudio sobre el papel de las citocinas en la EG data de 1981 (207). Sin embargo es en 1986 Michelakakis (65) quien encuentra por primera vez niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias en la EG. En este estudio se encuentran elevaciones ligeras de TNF- α en pacientes afectados de EG tipo 1 y concentraciones mayores en pacientes con EG tipo 2 y 3. En este estudio se encuentran también niveles elevados de IL-6 e IL-10, resultados confirmados igualmente en otros estudios (316). Los niveles elevados de IL-6 se estudiaron en relación a la prevalencia de gammapatías monoclonales y biclonales. Se ha comprobado como las mayores concentraciones de IL-6 las presentan los pacientes que muestran una expansión clonal de células B. La función de IL-6 como estimulante de células de estirpe B se conoce previamente (315) y como se ha mencionado previamente una alta prevalencia de gammapatías (314),

- INTRODUCCIÓN -

mieloma múltiple (215) y leucemia linfocítica crónica (250) se ha asociado a la EG. La IL-10 puede jugar un papel en el metabolismo óseo (317); sin embargo en estos estudios (65,316) no se ha encontrado relación entre los niveles elevados y la enfermedad ósea. Hollak (318) encontró niveles elevados de IL-8 en pacientes esplenectomizados. El papel de esta citocina en los procesos de quimiotaxis supondría la existencia de una atracción aumentada y activación de leucocitos.

Los niveles elevados de la citocinas pro-inflamatorias, especialmente IL-6 y TNF- α podrían ser uno de los orígenes del aumento del gasto energético y la producción de glucosa existente en la EG (299,319,320).

Recientemente se han comunicado elevaciones del Transforming growth factor β (TGF- β) en pacientes con EG en relación a individuos portadores y sanos. Además dicho factor de crecimiento presentaba una correlación significativa con el índice de gravedad de Zimran y la afectación esquelética. Sin embargo no parecen existir relación entre sus valores y la expresión fenotípica, por lo que podría tratarse de un marcador de activación macrofágica (321).

En el estudio de Hollak (318) se encuentran elevaciones de hasta 2-5 veces los valores normales de M-CSF en la mayoría de los pacientes con EG tipo 1. M-CSF regula el crecimiento y diferenciación de la línea monocito-macrófago desde los progenitores a las células maduras (322). Se ha demostrado la acción del M-CSF sobre la síntesis de osteoclastos (323) y el aclaramiento y metabolismo de lipoproteínas y colesterol (324); lo que podría suponer que el M-CSF jugara un papel en la fisiopatología de la osteopenia y aumento de resorción ósea, e incluso en los niveles disminuidos de lipoproteínas (299). También se han encontrado concentraciones elevadas del antígeno activador de la diferenciación de los monocitos a macrófagos (sCD14) (318). Existe una correlación positiva entre los niveles de M-CSF y sCD14 y el score de Zimran (SSI) (169,195,318), lo que convierte a estos marcadores en útiles en la monitorización de los pacientes. Además se ha comprobado un descenso significativo de los mismos durante el TES (299).

5.2.5 Factores de la coagulación y fibrinólisis

Desde hace años se ha comunicado la existencia de déficits de factores de la coagulación en pacientes con EG (201,325). Hollak (326) estudió en un grupo de 30 pacientes distintos parámetros de la coagulación y fibrinólisis. El tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y el tiempo de protrombina (TP) se encontraban prolongados en el 42% y 38% de los pacientes, respectivamente. Se encontraron déficits importantes (<50%) de los factores XI, XII, VII, X, V and II en el 30-60% de los pacientes. Algunos factores como el V se encontraron muy reducidos en pacientes con esplenomegalia masiva, lo que explicaría que el bazo pudiera jugar un papel importante en el aclaramiento de estos factores. La presencia de factores de coagulación disminuidos en pacientes esplenectomizados significa que el bazo no es el único órgano responsable de las alteraciones. Además, se encontraron elevados marcadores de activación de la coagulación (Complejo trombina-antitrombina) y de la fibrinólisis (complejo plasmina- α -2-antiplasmina y el D-dímero), especialmente en pacientes esplenectomizados. Tras 12 meses de TES existía una corrección parcial de estas alteraciones. Se especula que estos procesos son inducidos por las citocinas liberadas por los macrófagos. Aunque la tendencia hemorrágica se relaciona normalmente con el grado de trombocitopenia, la presencia de niveles disminuidos de factores de la coagulación puede contribuir a la diátesis hemorrágica (299).

5.2.6 Hidrolasas lisosomales, enzima convertidora de angiotensina y lisozima

Los niveles de algunas hidrolasas lisosomales se encuentran generalmente elevados en los pacientes sintomáticos con EG (327). La actividad de β -hexosaminidasa se encuentra aumentada en el plasma de la mayoría de pacientes con EG, y el aumento promedio es aproximadamente de dos veces. El aumento se realiza fundamentalmente a expensas de la β -hexosaminidasa B (328). Los niveles plasmáticos de otras hidrolasas lisosomales, α -manosidasa y β -glucuronidasa, también están aumentados en algunos pacientes con EG (329). La actividad de la lisozima se encuentra elevada igualmente en algunos pacientes (330) y la enzima convertidora de angiotensina (ECA) también se eleva aunque existe una variación interindividual muy marcada desde rango normal hasta 10 veces los valores normales (195,330).

El origen del aumento de las hidrolasas lisosomales en el suero de los pacientes de EG se desconoce. Es posible que estas enzimas sean secretadas por las células de Gaucher o por células activadas que intentan eliminar el material de depósito (299).

5.2.7 Fosfatasa ácida tartrato resistente

Se conoce desde hace años que la actividad de la fosfatasa ácida tartrato resistente se encuentra elevada en muchos pacientes con EG (331). La isoenzima elevada es la 5B (299,332). La demostración de niveles elevados de esta enzima puede apoyar el diagnóstico de EG, sin embargo esta anomalía no es exclusiva de esta enfermedad. Además, las determinaciones rutinarias de la fosfatasa ácida tartrato resistente no son completamente específicas para el isoenzima. Una determinación más específica sería su realización en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol (333,334). Recientemente se han obtenido anticuerpos monoclonales que reconocen de forma específica a la isoenzima 5B, lo que permite su determinación específica (335). En la interpretación de los niveles plasmáticos de fosfatasa ácida plasmática hay que tener en cuenta que son edad dependiente y por tanto los niveles están más elevados en los niños (334). El hecho de que la fosfatasa ácida tartrato resistente se sintetice en los osteoclastos ha estimulado la idea de que los niveles plasmáticos se correlacionarían específicamente con la extensión de la enfermedad ósea (299). Sin embargo es bastante probable que su síntesis tenga lugar en las células de Gaucher en distintos órganos. Los estudios inmunocitoquímicos en bazo han demostrado que su síntesis tiene lugar no sólo en las células de Gaucher sino también en sus precursores los monocitos (336). Además la esplenectomía provoca una marcada reducción de los niveles de fosfatasa ácida (299). Por lo tanto dado el origen complejo de la fosfatasa ácida sérica es cuestionable si este marcador es específico de la extensión de la enfermedad ósea. El TES ha demostrado reducir de forma rápida los niveles de fosfatasa ácida, pero con frecuencia de forma parcial (22).

5.2.8 Quitotriosidasa

Las quitinasas están presentes en varias especies, incluyendo bacterias, hongos, nematodos, plantas, insectos y peces (337). Hasta la última década se había creído que el hombre y los mamíferos no poseían una quitinasa análoga (338,339). En 1994 Hollak comunica la existencia de una enzima con actividad quitinolítica en el hombre, dicha enzima recibe el nombre de quitotriosidasa (QT), y es secretada por los macrófagos

- INTRODUCCIÓN -

activados (340). Tanto la secuencia N-terminal como interna sugieren una homología de la QT humana purificada con otras proteínas de la familia de las quitinasas. La purificación de la enzima y la clonación del cDNA confirma que pertenece a la familia de 18 glucosilhidrolasas, compartiendo secuencias idénticas a otras quitinasas de otras especies (341). La acción antifúngica de las quitinasas homólogas en plantas así como la expresión regulada de QT en macrófagos sugieren que la QT pudiera tener como función la degradación de patógenos con quitina (342). El gen de la QT se asigna al cromosoma 1 (1q31-q32). El gen posee 12 exones y se expande a lo largo de 20 kilobases. Se ha comprobado la existencia de déficit de QT, que en población holandesa se sitúa en el 6% de la población general. Recientemente se ha comprobado que dicho déficit se debe a la existencia de una duplicación de 24 pares de bases en el exón 10 que activa una región de splicing críptica 3' en el mismo exón, lo que origina la formación de un RNAm con una delección de 87 nucleótidos. Todos los individuos deficientes en QT son homocigotos para la duplicación de 24 pares de bases. Dicha duplicación se ha comprobado ser multiétnica. Basado en la incidencia de déficit de QT se establece que aproximadamente el 30-40% de la población general es portadora de la duplicación en el gen de la QT (342, 343).

La actividad de QT puede encontrarse elevada en enfermedades donde exista una activación del macrófago; pero en ningún caso se alcanza la actividad encontrada en pacientes con EG. Hollak (340) encontró actividad aumentada en más de 600 veces los valores medios en individuos control. Además se comprobó como durante el TES existe una reducción dramática, lo que convierte a la actividad de QT en un posible marcador en la monitorización de los pacientes sometidos a TES. En posteriores estudios se ha confirmado elevación significativa de la actividad de QT hasta en 11 enfermedades lisosomales (en un 28% de los pacientes) (344). Sin embargo en ninguna de ellas se encontró elevaciones semejantes a la EG. Sin embargo, recientemente se ha comprobado como en pacientes con β -talasemia sometidos a regímenes de transfusión intensiva y por lo tanto con un grado muy elevado de acúmulo de hierro (>3000 ng/ml) pueden encontrarse actividad de QT en el rango de la EG (345).

La actividad de QT se encuentra significativamente más elevada en los pacientes con EG no portadores del defecto en el gen de la QT, teniéndose que tener en cuenta este hecho a la hora de interpretar la actividad de QT tanto en pacientes tratados como no

tratados. En los pacientes tratados existe un descenso expresado en porcentaje semejante para ambos grupos durante el primer año de tratamiento, posteriormente el descenso es más lento en los pacientes portadores del defecto (342).

En relación a la respuesta al TES, si bien se ha comprobado el descenso continuo durante el mismo, la actividad permanece elevada, a pesar de que el paciente se encuentre asintomático. Por ello algunos autores creen que no puede ser considerado un marcador directo de la respuesta al tratamiento (346,347). Sin embargo si se ha visto que la actividad de QT depende de la continuación del TES y se convierte en un marcador muy sensible de cualquier interrupción del mismo. Dicha elevación tras la retirada del tratamiento es más evidente en los pacientes esplenectomizados.

La reducción de la actividad de QT es más dramática y prácticamente alcanza la normalización en los pacientes sometidos a transplante de médula ósea; este hallazgo puede suponer una mayor reducción de los depósitos de glucocerebrosido con el transplante de médula ósea y ofrece una evidencia directa de que la terapia génica usando células madres será probablemente más efectiva que el TES en el tratamiento de la EG debido a la liberación similar del enzima tanto en el transplante de médula ósea como en la terapia génica (348).

6. ASPECTOS HISTOLÓGICOS

En la actualidad el diagnóstico morfológico ha quedado relegado por el enzimático hasta el punto que en países con alta prevalencia se contraindican la realización de punción medular, biopsia ósea u otras técnicas invasivas. Sin embargo, sigue siendo de gran interés en las esplenomegalias asintomáticas del niño y el adulto joven, permitiendo un diagnóstico casi inmediato, excluyendo causas neoplásicas y orientando la información diagnóstica a las familias (349).

6.1 La célula de Gaucher

Las células de Gaucher son células gigantes, con un tamaño que oscila entre 20 y 100 micras. Presenta una forma redondeada u ovalada con un núcleo, generalmente único, que se sitúa en posición excéntrica. La cromatina nuclear es propia de un elemento maduro y con frecuencia presenta degeneración picnótica. El citoplasma es amplio, de

- INTRODUCCIÓN -

contornos poco definidos con aspecto de papel de pergamino o seda arrugado. En las células con depósito más incipiente el citoplasma es más basófilo (350).

Los elementos lipídicos de las células de Gaucher son fuertemente positivos con las técnicas del PAS, fosfatasa ácida tartrato resistente y alfa-naftil-butirato-esterasa. Presenta metacromasia con el azul de toluidina. El análisis de las isoenzimas de la fosfatasa ácida muestra una banda 0 característica de la EG. Mediante marcadores de superficie (lisozima y CD68) se confirma la filiación de la célula de Gaucher al sistema mononuclear fagocítico (349,350).

Las células de Gaucher deben diferenciarse de los macrófagos gigantes que se observan en otros muchos procesos como la leucemia mieloide crónica (351,352), talasemias (353), anemias diseritropoyéticas congénitas (354) y procesos infecciosos intracelulares. En general estas células son menos numerosas, más pequeñas y no forman acúmulos.

La ultraestructura de la célula de Gaucher revela un citoplasma repleto de vesículas dilatadas, rodeadas de membrana, que contienen estructuras características de aspecto tubular (56,355), originadas por la polimerización del glucocerebrosido y donde se localiza la actividad enzimática de la fosfatasa ácida. Estas estructuras tubulares tienen un diámetro que oscila entre 120 y 750 Å. La longitud de los túbulos puede llegar a 5 micras. Cada túbulo contiene 10-12 fibrillas retorcidas a lo largo del eje del túbulo como una hélice de rotación diestra.

6.2 Bazo

La esplenomegalia progresiva es un hallazgo frecuente en la EG. Macroscópicamente el bazo conserva su estructura aunque con una consistencia aumentada y firme. La superficie esplénica es a menudo nodular, de color purpúrico o pardo-rojizo como consecuencia de acúmulos locales de células de Gaucher junto con zonas de hematopoyesis extramedular, fibrosis e infartos (356). Los estudios ultraestructurales demuestran la existencia de eritrofagocitosis por las células de Gaucher (357).

6.3 Hígado

El hígado es el principal órgano de acúmulo de glucosilceramida como consecuencia de la existencia de las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. Macroscópicamente

suele presentar una superficie de consistencia aumentada con áreas pardo-amarillentas o rojo-purpúricas, debido al acúmulo de células de Gaucher, o bien, áreas de hematopoyesis extramedular. Los estudios histológicos muestran la existencia de acúmulos de células de Gaucher alrededor de las venas hepáticas con aumento del tejido conectivo. Mediante microscopía electrónica se confirma la existencia de estructuras tubulares en el interior de los lisosomas (357). La fibrosis periportal progresiva, con puentes fibrosos y regeneración hepatocelular, puede desembocar en algunos pacientes en un cuadro de cirrosis, aunque ello no es frecuente (358).

6.4 Ganglios linfáticos

Es frecuente el hallazgo de células de Gaucher a nivel de los ganglios linfáticos, timo y amígdalas. Los ganglios linfáticos superficiales rara vez aumentan de tamaño, sin embargo los ganglios torácicos y abdominales pueden aumentar de tamaño y adquirir una coloración rojo oscura, roja amarillenta o pardo-negruzca. Una localización frecuente en pacientes esplenectomizados es la región retroperitoneal (198). Existe infiltración de la región medular de los ganglios linfáticos, habitualmente acompañado de adelgazamiento de la cápsula (357).

6.5. Médula ósea

Los estudios histomorfométricos óseos revelan la existencia de una arquitectura ósea anómala con pérdida de trabéculas, corticales trabeculadas y aumento del número de osteoclastos (209). Las células de Gaucher pueden encontrarse dentro de los conductos de Havers. Además existe un importante recambio intramedular por macrófagos cargados de glucosilceramida además de fibrosis e infartos. Es posible encontrar cambios escleróticos resultado de la calcificación distrófica de los acúmulos necróticos de células de Gaucher (357). Puede existir extensión extraósea con extravasación de células de Gaucher y formación de tractos sinusoidales como consecuencia de la erosión cortical y semejar un proceso maligno (214). Los estudios de biopsia ósea revelan la existencia de las células de Gaucher formando acúmulos, rodeadas de fibras de reticulina.

El desplazamiento de la médula ósea por infiltración progresiva de las células de Gaucher junto con los secuestros esplénicos da origen a la anemia, trombocitopenia y menos frecuentemente leucopenia (357).

6.6 Sistema pulmonar y cardiovascular

Se han descrito tres patrones de patología pulmonar en la EG: 1) infiltración intersticial de células de Gaucher, a nivel perivascular, peribronquial y septal acompañado de fibrosis, 2) consolidación alveolar como consecuencia del llenado de los espacios alveolares por células de Gaucher semejando una neumonía lobar y 3) células de Gaucher ocluyendo los capilares con hipertensión pulmonar secundaria (357).

La afectación primaria cardíaca es extremadamente rara en la EG; en alguna ocasión se ha comunicado infiltración miocárdica por células de Gaucher (359). Se han encontrado calcificaciones de la aorta ascendente, válvula mitral y aorta en pacientes afectados de la mutación D409H en homocigosis (160,296).

6.7 Sistema renal

Las células de Gaucher, posiblemente derivadas de macrófagos circulantes, han sido encontradas en el mesangio glomerular y entre las células intersticiales del tejido renal (360).

6.8. Sistema gastrointestinal

Se han encontrado células de Gaucher a nivel de las placas de Peyer, así como en otras localizaciones del tracto gastrointestinal (357).

7. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER

7.1 Diagnóstico morfológico

Clásicamente, el diagnóstico de EG se ha realizado por la observación de las células específicas: las células de Gaucher. Sin embargo, existe la posibilidad de encontrar células muy similares, “células pseudo-Gaucher”, en una gran variedad de entidades distintas como la leucemia crónica granulocítica (351,352), talasemia (353), mieloma múltiple (215) y enfermedad de Hodgkin (361). También se ha descrito un caso con este tipo de células en un paciente con una infección por *Mycobacterium avium* intracelular y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (362). Alrededor de un 30% de pacientes

con leucemia mieloide crónica presentan células pseudo-Gaucher en la microscopía óptica. Como se ha descrito anteriormente, estas células pseudo-Gaucher no contienen las típicas estructuras tubulares de las células de Gaucher (56,355). Debido a que el examen de microscopía óptica precisa la realización de una técnica invasiva y ésta no es específica, el diagnóstico histológico de la EG a través de esta técnica debería representar un porcentaje pequeño de pacientes en los cuales no se habría sospechado previamente la posibilidad de tal enfermedad (363).

7.2 Diagnóstico enzimático

Una gran cantidad de experimentos, en los cuales se ha implicado a los leucocitos, cultivos de fibroblastos cutáneos, células del líquido amniótico y vellosidades coriónicas, han sido llevados a cabo para poder establecer el diagnóstico de EG (364,365). Los leucocitos normales de la sangre periférica contienen una gran cantidad de β -glucosidasa ácida y la actividad de la misma está marcadamente disminuida en la EG (10). La utilización de substratos naturales marcados radiactivamente es mucho más dificultosa que la utilización de substratos artificiales, y la utilización del substrato soluble en agua 4-metil-umbeliferil- β -D-glucopiranosido (4-MU- Glc) ha simplificado el diagnóstico. A un pH de 5, el 4-MU- Glc se une prácticamente igual a los leucocitos de los pacientes con EG que a los sujetos sanos controles, pero a pH de 4 la actividad de los leucocitos de los pacientes con EG es únicamente alrededor del 10% de lo normal; de tal manera que el hallazgo de una actividad por debajo del 15% de la media es diagnóstica de enfermedad (366). Valores similares se han obtenido tras una gran variedad de ensayos enzimáticos realizados con substratos fluorescentes y lisados celulares con detergentes añadidos (367), pero para obtener el rendimiento más óptimo de estas técnicas se sabe que es necesario procesar las muestras de sangre dentro de las 24 horas siguientes a la extracción de la misma.

Ha sido difícil desarrollar un sistema de ensayo “in vitro” que representara el ambiente nativo de la enzima en la célula; consecuentemente, la determinación “in vitro” de la actividad de la β -glucosidasa ácida no refleja adecuadamente la capacidad hidrolítica hacia la glucosilceramida y, debido a esto, el nivel “in vitro” de la actividad enzimática no permite distinguir las formas neuronopáticas de las no neuronopáticas.

- INTRODUCCIÓN -

En los pacientes heterocigotos, los leucocitos y los fibroblastos cutáneos cultivados presentan alrededor de la mitad de actividad para la β -glucosidasa ácida, existiendo una considerable superposición (mayor del 20%) entre los rangos de actividad de los sujetos normales y los heterocigotos; esto condiciona un gran número de falsos positivos y negativos en los resultados. Debido a esto, se ha intentado la utilización de gran variedad de métodos, incluso combinados, para asegurar o distinguir el estado de portador. Así por ejemplo, la actividad enzimática medida con el 4-MU Glc y la existencia de un antígeno medido con anticuerpos monoclonales contra la β -glucosidasa ácida, tiende a ser menor en el tipo 2 y 3 de EG pero con una superposición considerable (368). También parece ser que la estabilidad del enzima en el tipo 2 está habitualmente disminuida mientras aparece normal en los tipos 1, pero existen excepciones a esta regla.

Por último señalar que la actividad de quitotriosidasa se ha convertido en un importante marcador de EG como ya se ha señalado debido a la correlación que guarda con la gravedad de la enfermedad, su mayor elevación en relación a otras enfermedades y su utilidad en la monitorización del tratamiento (340).

7.3 Diagnóstico genético

La tecnología basada en el análisis del DNA presenta mayores ventajas que el análisis enzimático en cuanto al diagnóstico en la EG, puesto que tales resultados son de origen cualitativo y las muestras para su determinación son muy estables. El inconveniente que presenta este tipo de análisis es que, si bien los alelos defectuosos más frecuentes son fáciles de encontrar, no ocurre lo mismo cuando las mutaciones que presenta el sujeto problema no son las habituales. El “screening” de las mutaciones N370S, 84GG, L444P y IVS2+1 permite identificar más del 90% de los alelos mutados en población judía, mientras que sólo identifica el 62% en población no judía; donde con gran frecuencia encontramos mutaciones presentes únicamente en una familia con EG (143). En este caso será necesario elaborar complejas estrategias basadas en las modernas técnicas de la biología molecular.

7.4 Diagnóstico prenatal

Tests prenatales disponibles. El diagnóstico prenatal se puede establecer mediante la determinación de la actividad de β -glucosidasa ácida en cultivo de amniocitos o tras biopsia coriónica. En estos casos, una actividad entre el 0-15% del rango normal es diagnóstica de EG (29). También se puede realizar análisis del DNA, sobre todo en aquellos casos en que se conocen las mutaciones.

Familias con casos de EG ya diagnosticados. En familias en las que ya existe un hijo afecto de EG, en las que los padres no presentan la enfermedad, el fenotipo neuronopático o no neuronopático será concordante prácticamente en todos los casos en la descendencia. En los casos con EG tipo 2 y 3 el curso clínico será semejante en la descendencia afecta. Sin embargo el curso clínico en familias en riesgo para EG tipo 1 puede presentar diferencias sustanciales en relación al grado de afectación. Es habitual encontrar un hermano con enfermedad hepática y esplénica grave mientras que otro destaque por su afectación ósea. Por lo tanto en familias con casos previos de EG tipo 1, el curso clínico de lo mismos no es suficiente para establecer el posible grado de afectación en la descendencia (369).

Familias en riesgo detectadas por screening poblacional. En estos casos si se detecta una mutación no habitual difícilmente se pueden establecer orientaciones en relación al pronóstico. Cuando las mutaciones más habituales son detectadas, la correlación genotipo-fenotipo puede orientar al pronóstico en dichas familias. De esta manera la mutación N370S en presencia de cualquier otra mutación se asocia con una forma no neuronopática de la enfermedad (34). En general, los individuos homocigotos para la mutación N370S tienen un inicio más tardío de la sintomatología y una afectación visceral más leve que individuos portadores de dicha mutación en combinación con otras. Sin embargo hasta un 20% de los individuos homocigotos pueden tener un inicio más precoz con un grado de afectación más grave (369). La detección de homocigosis para la mutación L444P se asocia con formas neuronopáticas de la enfermedad (176). Además en estos casos existe de una forma prácticamente invariable inicio precoz de la sintomatología antes de los 2 años de edad. Por último la detección de homocigosis para la mutación D409H se asocia de forma invariable con el tipo 3c de la enfermedad (160,296).

La predicción del tipo de EG si uno de los progenitores es afecto y el otro portador es más complicada. El genotipo de los padres puede aportar información esencial para el consejo genético. Así por ejemplo, si el progenitor afecto es homocigoto para la mutación N370S y el progenitor portador posee la mutación 84GG, un posible hijo afecto tendrá un genotipo N370S/84GG, compatible con EG tipo 1 posiblemente de inicio temprano y con mayor afectación visceral que su progenitor. Sin embargo si el progenitor enfermo presenta un genotipo N370S/84GG y el portador presenta la mutación L444P, los hijos afectados tendrán el genotipo N370S/L444P o 84GG/L444P. El primer caso corresponderá a una EG tipo 1, sin embargo el segundo posiblemente desarrollará una forma tipo 2 (369).

En resumen en relación al diagnóstico prenatal en familias en riesgo de presentar descendencia afectada de EG, la posibilidad de predecir la existencia o no de formas neuropáticas de la enfermedad es de gran utilidad, sin embargo la gran dificultad existente a la hora de predecir la progresión de la enfermedad añade una importante complejidad al consejo genético.

8. TRATAMIENTO EN LA ENFERMEDAD DE GAUCHER

La EG ha sido durante mucho tiempo objeto de atención médica solamente desde una perspectiva sintomática y humanitaria. Esta situación ha cambiado a comienzos de la última década con la aparición del TES.

8.1 Tratamiento sintomático

A pesar de la introducción del TES, el tratamiento sintomático sigue teniendo gran importancia en la atención integral del paciente con EG, siendo un complemento primordial del mismo.

8.1.1 Enfermedad ósea

Dentro del tratamiento médico en la enfermedad ósea hay que tener en cuenta que el paciente con EG ósea puede presentar aunque sea de forma esporádica crisis de dolor óseo, dolor crónico o dolor agudo secundario a una fractura o infarto óseo. Cada una de estas situaciones requieren una atención individualizada. Las opciones médicas son diversas, analgésicos moderados como el paracetamol o aspirina u otros

- INTRODUCCIÓN -

antiinflamatorios no esteroideos. Los recientemente descritos inhibidores de la isoforma 2 de la ciclooxigenasa (COX2) han mejorado considerablemente su seguridad y poseen un perfil de eficacia similar en relación con los inhibidores clásicos del COX1 (370). Además, debido a su efecto protector plaquetario, estos analgésicos podrían ser de elección el tratamiento del dolor crónico. En los últimos años se ha comunicado una buena respuesta al uso de metilprednisolona en el tratamiento de las crisis óseas rebeldes a otros analgésicos convencionales (371,372); sin embargo este tratamiento debe quedar en un segundo plano debido a sus posibles efectos adversos sobre todo en los pacientes pediátricos. En situaciones en las que las crisis óseas o el dolor óseo crónico resulta muy invalidante se ha probado con cierto éxito el uso de morfina o derivados morfínicos tanto en administración oral como intravenosa (373).

Los bifosfonatos han mostrado buena eficacia terapéutica en la EG. Los bifosfonatos son potentes inhibidores de la resorción ósea mediante la inhibición de la actividad osteoclástica (374). Posiblemente la acción de los bifosfonatos como ha sido comunicado en pequeñas series pueda potenciar al TES en el tratamiento de la osteopenia y las lesiones locales (375,376,377). Es preciso la realización de ensayos clínicos controlados y randomizados para establecer la utilidad de los bifosfonatos en la EG. Dentro de las distintas familias de bifosfonatos utilizados probablemente el alendronato por su gran eficacia combinado con la posibilidad de su administración oral sea el que más garantías ofrece (378).

El papel del calcio y la vitamina D en la EG no ha sido suficientemente estudiado. En el caso de la vitamina D se ha comprobado que su utilización en dosis altas (50000 unidades semanales) puede disminuir la aparición de complicaciones óseas (373).

Finalmente se debe evitar la actividad física excesiva; la natación sigue siendo considerada como el deporte de elección en los pacientes con EG en todas las edades.

El tratamiento quirúrgico en la enfermedad ósea se limita fundamentalmente a las fracturas y a la necrosis avascular fundamentalmente de la cabeza femoral. En este último caso la sustitución articular es el tratamiento de elección (373). Los problemas de esta técnica son el riesgo de infección y hemorragia, el uso de prótesis cementadas ancladas en una matriz que progresivamente se deteriora (379) y la imposibilidad de

predecir el pronóstico, particularmente en pacientes jóvenes (380) debido a la continua infiltración por las células de Gaucher (381). En general la sustitución articular no se debe realizar en niños porque altera el cartílago de crecimiento y la prótesis tiene una vida media relativamente corta. Otras articulaciones como el hombro y la rodilla si bien se ven afectadas con menor frecuencia son también susceptibles de tratamiento quirúrgico mediante sustitución articular. En cuanto a la afectación de la columna vertebral, tanto las fracturas por compresión como la cifosis secundaria a la progresión de la enfermedad ósea son generalmente tratadas de forma conservadora (382).

8.1.2 Enfermedad hematológica

La anemia raramente requiere la administración de transfusiones porque por lo general es leve o moderada y cursa de forma asintomática. Lo mismo sucede con la leucopenia. Por el contrario, la trombocitopenia es la más frecuente y grave de las citopenias en la EG (383,384). Como las restantes citopenias, la trombocitopenia es principalmente secundaria al hiperesplenismo, aunque se hayan descrito mecanismos de carácter inmune (385,386) y por ocupación medular. En los casos leves la infusión de desmopresina (DDAVP) previa a la cirugía puede acortar el tiempo de hemorragia (387). En los casos de trombocitopenia grave se ha recurrido clásicamente a la esplenectomía total o parcial (383,384). Sin embargo desde que se dispone del TES, la esplenectomía no debe considerarse como una primera opción; su uso debe quedar restringido a situaciones infrecuentes en que el TES resulta ineficaz como puede ser la existencia de un descenso plaquetario persistente inferior a 40000, dolor abdominal secundario a infarto esplénico que no remite, retraso de crecimiento y compromiso cardiopulmonar sin respuesta al TES (245). Además se cree que eliminando el principal reservorio de glucolípidos se aceleraría el depósito en otros órganos como la médula ósea y el hígado, y en las formas tipo 3 en el sistema nervioso central. En este sentido existen resultados contradictorios en las distintas series en las que se ha estudiado el efecto de la esplenectomía (245,384). En el caso de indicarse la esplenectomía es importante una adecuada profilaxis para prevenir procesos sépticos (245). Además es conveniente la vacunación frente al neumococo, haemophilus influenzae tipo B y meningococo.

La esplenectomía parcial se introdujo en un intento por evitar los inconvenientes de la anesplenia en pacientes con EG. Sin embargo se ha observado un rápido crecimiento del

resto esplénico con recurrencia del hiperesplenismo, así como el desarrollo de nuevas complicaciones óseas (199).

8.2 Tratamiento enzimático sustitutivo

En la actualidad el TES constituye el tratamiento de elección de la EG. La disponibilidad de la enzima ha modificado radicalmente el perfil de los pacientes sintomáticos, integrándose más de lleno en la sociedad, mejorando su vitalidad, y disminuyendo su percepción de la enfermedad.

Brady y colaboradores iniciaron en los años 60 el camino hacia la terapia enzimática sustitutiva. Sin embargo fue un proceso dificultoso que requirió más de dos décadas para alcanzar un resultado satisfactorio (8). En la década de los 70 el grupo de investigadores dirigido por Brady descubrió que la placenta humana era uno de los tejidos más ricos en GC. En 1974 Brady demostró en dos pacientes esplenectomizados la reducción de glucocerebrosidos en plasma y tejido hepático tras infusión de un extracto purificado del enzima obtenido de placenta humana (15). Sin embargo los resultados en otros pacientes con un mayor acumulo de glucocerebrosidos en hígado fueron contradictorios. En esas fechas se conocía que los glucocerebrosidos se originaban de las membranas de las células rojas y blancas y que el catabolismo de esos materiales tenía lugar en los macrófagos en el hígado, bazo y médula ósea (16). El siguiente paso fue dirigir la GC a los macrófagos tisulares; conociéndose que los macrófagos tenían en su superficie lugares específicos de reacción para radicales de manosa (17) lo que hacía posible la hipótesis de que el aumento en la expresión de los mismos en la enzima exógena facilitaría su captación por los macrófagos. Esta hipótesis se confirmó pronto al demostrarse que la GC modificada mediante la escisión enzimática de los tres residuos externos de carbohidrato que exponían radicales manosa era eficaz clínicamente (18-21). Los primeros ensayos clínicos con éxito se comunicaron a principios de la década de los 90 (22-25). En los últimos años se ha introducido un producto totalmente sintético que difiere de la enzima placentaria únicamente en un aminoácido lo que evita los riesgos potenciales de contaminación por impurezas hormonales del extracto placentario (26).

8.2.1 Fármacos utilizados

El primer fármaco utilizado, la alglucerasa, se obtenía a partir de la β -glucocerebrosidasa placentaria humana mediante un complejo proceso de extracción química y posterior modificación de las cadenas de oligosacáridos que conduce a la exposición de residuos manosa reconocidos por los macrófagos. En su forma final, la enzima poseía 497 aminoácidos y una reducción de carbohidratos del 12 al 6% (26). En los últimos años se utiliza de forma exclusiva la imiglucerasa, glicoproteína monómera de 497 aminoácidos, producto sintético que difiere de la alglucerasa en un aminoácido localizado en posición 495 donde la histidina es sustituida por arginina. Las propiedades farmacocinéticas son semejantes para los dos fármacos (388).

8.2.2 Indicaciones

Inicialmente sólo los enfermos sintomáticos eran tributarios de tratamiento, no contemplándose las indicaciones de carácter profiláctico. Como única excepción a esta regla se admitía el inicio de TES en pacientes asintomáticos con afectación ósea extensa demostrada por cualquier medio (389). A modo de resumen las indicaciones iniciales aceptadas para iniciar el tratamiento quedan reflejadas en la Tabla 13.

Tabla 13. Indicaciones del TES

Iniciar el tratamiento	1. Pacientes sintomáticos. 2. Pacientes asintomáticos con afectación radiológica ósea grave.
Considerar firmemente Iniciar tratamiento	1. Niños menores de 5 años con síntomas aún leves. 2. Niños con hermanos afectados de enfermedad grave o progresiva ya en edad pediátrica.
Considerar la posibilidad de tratamiento	Enfermos que muestran signos de progresión, aún de modo subclínico, a cualquier edad.

En la actualidad el TES se ha extendido prácticamente a todos los pacientes diagnosticados en los primeros años de la infancia, incluso en individuos prácticamente asintomáticos; siendo el retraso de crecimiento y la sospecha de una forma neuronopática una de las causas más frecuentes que condiciona su inicio (245).

8.2.3 Pautas de dosificación

Desde el inicio del TES ha existido una notable controversia en relación al esquema terapéutico a utilizar (390). En las primeras series (22) se utilizó el régimen de dosis alta / baja frecuencia (60 U / kg / 2 semanas), aunque al poco tiempo Beutler aportó su experiencia (391,392) en pacientes tratados con el régimen de dosis baja / alta frecuencia (2,3 U / kg / 3 veces por semana. Este esquema podía suponer un ahorro del 75% de la cantidad del enzima sin merma de la eficacia.

Los partidarios de los esquemas de dosis altas sostienen que la lenta acumulación del cerebrósido es reversible en dependencia de la cantidad de enzima administrada más que de la frecuencia de la dosis (393) e igualmente garantizaría la persistencia de su eficacia a pesar de la reducción de la dosis una vez obtenida la respuesta inicial (394). Por el contrario, los defensores de las dosis más bajas, basándose en la cinética de la interacción enzima-receptor, estiman que la administración de dosis tan elevadas satura estos últimos y la enzima se degrada sin ejercer una acción terapéutica (23,36). Se ha comprobado como no sólo los macrófagos sino otras células como las endoteliales pueden captar el enzima y por lo tanto una importante parte del mismo se estaría desaprovechando (395). Mistry (396) ha demostrado mediante infusiones de enzima marcada con yodo radioactivo que ésta es captada por hígado, bazo y médula ósea. La captación se produce de modo desigual, siendo cuantitativamente más importante en el hígado y en los focos de enfermedad a nivel del hueso y dependiendo del volumen del bazo. En este mismo trabajo comprueba que los macrófagos captan e internalizan el enzima gracias a un receptor específico que se satura con dosis de enzima relativamente bajas (5 U/kg). Esta es la primera evidencia fisiopatológica a favor de la administración de dosis bajas en el tratamiento de la EG, puesto que la saturación del receptor se acompaña de un alargamiento de la vida media plasmática de la enzima y un consiguiente incremento de la eliminación urinaria de la misma.

- INTRODUCCIÓN -

Beutler (397) recomienda la utilización de una dosis inicial de 15-30 U / kg / mes con infusión del fármaco durante 2 horas 3 días a la semana. En casos excepcionales si no existe respuesta en 6-12 meses la dosis debe ser doblada. Según este autor no existe justificación para iniciar el tratamiento con una dosis superior a 30 U / kg / mes al considerar incorrecta la idea de que la dosis debe estar basada en la gravedad de la enfermedad ya que se ha comprobado que la respuesta es mucho mayor en los pacientes con mayor organomegalia (398). Sin embargo en muchas ocasiones se ha comprobado como series de pacientes tratados con el esquema de dosis bajas han precisado incrementos notables en la dosis para controlar la sintomatología, concretamente Hollak (399) presenta una serie donde al final del estudio sólo un 25% de los pacientes continuaban con el esquema de dosis bajas. Al evaluar de forma retrospectiva el TES en España se encuentra un porcentaje semejante con los dos esquemas terapéuticos (400). No es posible conocer con exactitud la dosis mínima eficaz, que probablemente está, tal como indica el grupo de Hollak, alrededor de 20-30 U / kg / mes, aunque parece claro que independientemente del régimen elegido hay un grupo de pacientes muy sensibles al TES, que permitirán ajustes a la baja de la dosis con mayor facilidad que en el resto de los casos. De cualquier forma, también parece claro (al menos es la actitud de la mayoría de los autores) que la presencia de afectación ósea importante debe inducir a escoger dosis más altas y en régimen de administración quincenal (399). Lo que no ofrece dudas es el hecho de que para las manifestaciones no esqueléticas de la EG tipo 1 la dosis mínima eficaz se puede alcanzar tanto con el esquema de dosis elevadas con una reducción progresiva de la dosis o iniciando con la dosis mínima. La dosis mínima terapéutica puede establecerse aproximadamente en 10-15 U / kg / 2 semanas (401).

La principal ventaja que ofrece el esquema de dosis altas / baja frecuencia es la de garantizar una buena respuesta desde el principio, con el inconveniente del coste más elevado. Por el contrario, el de dosis bajas / alta frecuencia tiene la ventaja de señalar a los pacientes más sensibles al tratamiento con el subsiguiente ahorro, pero su mayor inconveniente es la incomodidad de depender de la administración de un fármaco intravenoso tres veces por semana (26). Dicho inconveniente se ha intentado solventar con éxito mediante el tratamiento domiciliario (402).

A modo de resumen señalar que la elección del régimen de dosis depende del estado clínico del paciente e individualizar en función de las características específicas de cada

- INTRODUCCIÓN -

caso. Si no existe afectación ósea importante y la clínica es poco llamativa, ambos regímenes son aceptables; por el contrario, en pacientes con clínica grave o con afectación ósea extensa o grave debería comenzarse con un esquema de dosis altas.

De gran interés en la monitorización de la respuesta al tratamiento junto a la evaluación clínica, radiológica y de marcadores clásicos, es la monitorización de la actividad de quitotriosidasa. El TES produce un llamativo descenso de la actividad, descenso que corre paralelo en líneas generales con la mejoría de la enfermedad, produciéndose un aumento de quitotriosidasa al suspender el TES, o cuando se reduce la dosis del enzima. Parece ser que existe una buena progresión de la EG cuando la actividad se reduce o se estabiliza y un empeoramiento cuando tiende a aumentar (340).

Antes del inicio del descenso de la dosis de la enzima es preciso haber alcanzado primero la normalización de los parámetros clínicos y analíticos y mantenerla durante 6 meses. A partir de ese momento podría reducirse la dosis en los esquemas de dosis altas en un 50% cada 6 meses hasta alcanzar una dosis mínima de 15 U / kg / 2 semanas (26). Sin embargo este esquema puede ser discutible en población pediátrica dado que se ha comprobado como la reducción de la dosis en un 50% de forma progresiva se relaciona con una mejoría insuficiente en los niveles de hemoglobina y plaquetas, así como en términos de crecimiento (403). Recientemente Elstein (404) aconseja en aquellos pacientes con normalización clínica durante un periodo de tiempo prolongado en TES la posibilidad de retirar el tratamiento y establecer controles clínicos para evaluar el posible reinicio del mismo. Esta posibilidad bastante discutida no debe ser considerada en niños debido fundamentalmente a que el retraso de crecimiento es una de las causas mayores de inicio de tratamiento en estos pacientes (245) por lo que es prudente mantener un esquema estable hasta la pubertad aunque exista una reducción significativa en las organomegalias y normalización de los parámetros hematológicos (404).

8.2.4 Respuesta al TES

Aunque la eficacia del tratamiento puede variar de unos pacientes a otros, especialmente dependiendo de la gravedad de la sintomatología, con carácter general puede esperarse el patrón de respuesta que se refleja en la Tabla 14 (26, 394).

Tabla 14. Respuesta al TES al año de inicio de tratamiento

Serie roja	1. Incremento de la hemoglobina en 1,5 g/dL 2. Normalización de las cifras en un 30-50% de pacientes.
Serie plaquetaria	1. Trombocitopenias graves: duplicación recuentos. 2. Trombocitopenias leves: normalización.
Volumen visceral	1. Reducción del volumen hepático en un 20-30%. 2. Reducción del volumen esplénico en un 30-50%.

La respuesta de otros aspectos de la enfermedad como la afectación ósea, neurológica, pulmonar resulta más difícil valorar y no existen criterios tan definidos como en el caso de las alteraciones hematológicas y organomegalias.

Respuesta visceral. La mayor evidencia de la respuesta al TES ha sido la medición del tamaño del hígado y bazo mediante distintas técnicas de imagen. Tanto la resonancia magnética, la tomografía axial computarizada y la ecografía ofrecen resultados reproducibles y con una correlación adecuada entre las distintas técnicas. El grado en que el hígado y bazo disminuyen durante el tratamiento está en relación directa con su volumen previo. Los estudios más amplios han demostrado no sólo la existencia de respuesta, sino que está es la misma independientemente de la dosis utilizada en el rango de 30 U / kg / mes y 130 U / kg / mes. Para una dosis de 15 U / kg / mes la respuesta es menor en aquellos pacientes con organomegalias masivas pero igual en aquellos con organomegalias moderadas (397,405-410).

Respuesta hematológica. Los datos hematológicos son sencillos de recoger pero no tanto de analizar. Muchos pacientes, particularmente aquellos esplenectomizados, no se encuentran anémicos o trombocitopénicos en el momento de inicio del tratamiento. Otros pacientes se encuentran policitémicos como consecuencia de la enfermedad pulmonar; en ellos un descenso de los niveles de hemoglobina y no un aumento representa la respuesta adecuada al tratamiento. Además tanto la edad como el sexo son factores importantes en la determinación de la respuesta al tratamiento (411). Los distintos estudios realizados no han demostrado una respuesta distinta entre las distintas dosis utilizadas salvo una menor respuesta a 15 U / kg / mes (397,405-407).

- INTRODUCCIÓN -

Respuesta esquelética. La evaluación de la respuesta esquelética en la EG al TES resulta complicada. Rosenthal (412) comprobó en una serie de 12 pacientes la existencia de respuesta al determinar mediante resonancia magnética un incremento en la fracción grasa medular con aumento de espesor de la cortical ósea y de la densidad trabecular a los 42 meses de iniciado el tratamiento. Inicialmente la respuesta es más rápida en el esqueleto infantil (413), observándose una recuperación de la señal medular en RM. Posteriormente, en el plazo de 2 a 4 años se observa un aclaramiento medular y mejora de la mineralización, con aumento de densidad ósea y engrosamiento cortical (228,414). Probablemente es la mayor dificultad del enzima por alcanzar la médula ósea lo que origina esta respuesta más lenta; según algunos autores esto justificaría la utilización de los esquemas de dosis altas / baja frecuencia en la enfermedad ósea (412). Se ha comprobado como la utilización de dosis bajas / alta frecuencia puede prevenir la aparición de fracturas pero no llega a suprimir las crisis óseas en pacientes con EG tipo 1 severa con inicio en edad juvenil (415). La respuesta de la médula ósea medida mediante resonancia magnética se correlaciona con la reducción en las visceromegalias (416).

Respuesta en el retraso de crecimiento. Existe evidencia de la respuesta positiva del crecimiento al TES. Kaplan (262) demostró la existencia de un crecimiento recuperador durante el primer año de tratamiento. La respuesta parece ser más importante en los pacientes tratados con dosis entre 60 y 120 U / kg / mes, si bien existen controversias en este sentido (411).

Respuesta de la enfermedad pulmonar. Se ha comunicado la respuesta favorable en pacientes con shunt derecha – izquierda como consecuencia de la hipertensión pulmonar desarrollada (239,246). Sin embargo también se han descrito casos que tras varios años de TES han desarrollado hipertensión pulmonar incluso con el fallecimiento del paciente (237). La elevada frecuencia encontrada en alguna serie (hasta un 7%) obliga según los autores a realizar exámenes rutinarios ecocardiográficos tanto en pacientes no tratados como tratados, estos últimos dado que existe evidencia de progresión de la hipertensión pulmonar durante el TES (238,239). Además se sugiere la posibilidad de retirar el tratamiento si el gradiente progresa más allá de 30 mmHg y que hay que diferenciar entre la hipertensión pulmonar secundaria que puede responder al TES y la hipertensión pulmonar primaria que aparece en algunos pacientes tratados y que

- INTRODUCCIÓN -

posiblemente pueda estar activada o agravada por el tratamiento (240). Sin embargo en otras series no se han documentado casos con progresión de la sintomatología debida a hipertensión pulmonar (241), posiblemente porque estos pacientes presenten comorbilidad que favorezca la predisposición a desarrollar hipertensión pulmonar. Aunque no se ha asociado la progresión de la hipertensión pulmonar con el régimen terapéutico utilizado en la serie de Elstein los pacientes recibieron en la mayoría de los casos dosis bajas, frente a otras series donde no se objetivo progresión y se utilizó el esquema de dosis elevadas – baja frecuencia (241). El pulmón, como el cerebro y posiblemente la médula ósea pueden representar zonas poco accesibles al enzima circulante. En estas situaciones un esquema de dosis bajas puede no ser suficiente e impedir una concentración adecuada del mismo sobre todo si existen zonas de fibrosis y necrosis. Por ello otros autores están en desacuerdo con la posibilidad de retirar el tratamiento en pacientes sintomáticos en los que ciertamente el riesgo de progresión de la enfermedad aumentaría sin existir una evidencia definitiva de la relación entre el tratamiento y la hipertensión pulmonar (241). Recientemente Mistry (242) estudió la existencia de hipertensión pulmonar en un grupo de 122 pacientes comprobando que aquellos en TES presentaban una incidencia menor de hipertensión pulmonar respecto a aquellos no tratados. En este estudio la presión pulmonar se correlacionaba con la edad, sexo femenino y la existencia de esplenectomía. Este autor encontró una buena respuesta en los casos afectos de hipertensión pulmonar al optimizar el TES y asociarlo a la terapia con vasodilatadores.

Respuesta de la enfermedad neurológica. En la enfermedad tipo 2 todos los intentos por controlar la evolución de las manifestaciones neurológicas han fracasado, si bien en algunos casos se han controlado las manifestaciones extraneurológicas de la enfermedad. La afectación pulmonar que pueden presentar estos pacientes resulta difícil de controlar con el TES (278). Posiblemente el TES puede alargar la vida de algunos pacientes, pero no modifica la progresión de la enfermedad neurológica. En un intento de permitir la acción del enzima en el sistema nervioso central Bembi (417) inyectó alglucerasa directamente en líquido cefaloraquídeo a de 3 pacientes afectos de EG tipo 2. Los pacientes recibieron una dosis de 5-20 U / kg / 4 semanas mediante una bomba de perfusión continua. De forma concomitante recibieron una dosis intravenosa de 240 U / kg / 4 semanas. La administración intraventricular no provocó efectos adversos, sin embargo la evolución neurológica de los pacientes no se modificó. Posiblemente sea

- INTRODUCCIÓN -

necesario un adecuado paso de la enzima a través de la barrera hematoencefálica y al interior de las neuronas para tratar de forma efectiva las manifestaciones cerebrales de esta enfermedad (278).

Los pacientes con EG tipo 3 presentan en muchas ocasiones un predominio de la afectación sistémica sobre la neurológica; en el control de la sintomatología extraneurológica el TES se ha mostrado eficaz como ocurre en los pacientes con EG tipo 1 si bien en la mayoría de las series ha sido preciso la utilización de dosis elevadas (278, 301). Schiffman (418) comprobó como con una dosis de 120 U / kg / 4 semanas existía un descenso de la actividad de quitotriosidasa y otros marcadores de actividad del macrófago a nivel del líquido cefalorraquídeo; dicho descenso supone una disminución del número de células de Gaucher en el espacio cerebral perivascular. Sin embargo en la actualidad el efecto del TES en la progresión de la enfermedad neurológica requiere un seguimiento más extenso. Es posible que algunos aspectos como el temblor o la parálisis supranuclear puedan controlarse o prevenirse con TES. Otras complicaciones como la encefalopatía mioclónica progresiva parece ser refractaria al tratamiento (278). En series recientes (419-421) se ha comprobado como la utilización de dosis elevadas (120 U / kg / 4 semanas o incluso mayores) no solo permite el control de la sintomatología visceral sino que puede estar indicada al ser capaz de detener la progresión y en algún caso mejorar la afectación neurológica de estos pacientes.

Influencia sobre la calidad de vida. Es evidente que existe una respuesta favorable al TES en la mayoría de los pacientes sometidos a tratamiento, sin embargo hasta la fecha existen pocos estudios que analicen la calidad de vida relacionada con la salud en estos pacientes, que áreas de la misma se ven afectadas y como influye el tratamiento en la percepción del paciente. Damiano (194) en una población de EG mayores de 14 años analizó la influencia del TES en aspectos físicos, mentales y de calidad de vida en general mediante cuestionario SF-36. Como cabía esperar los pacientes con EG presentaban puntuaciones inferiores a la población general ajustada por edad y sexo. Tanto la edad como el reemplazo articular se asociaban con una peor salud física. La ausencia de esplenectomía y la duración del TES se relacionaban con mejor salud mental. En general los pacientes mostraban una mejor percepción de su salud en relación al tratamiento. Rubio-Félix (422) muestra en el análisis de la calidad de vida en

pacientes con EG tipo I como la limitación en la actividad física de los pacientes se relaciona con la existencia dolor óseo moderado, necrosis y fracturas. Las crisis óseas no se relacionan con la limitación de la actividad física en este estudio posiblemente por su carácter transitorio. A pesar de que se objetiva como en el estudio de Damiano una mejoría significativa tras el TES, un 25% de los pacientes siguen presentando limitaciones físicas importantes como consecuencia de la enfermedad ósea. Otro aspecto todavía no estudiado debido a las dificultades que entraña es el análisis de la calidad de vida en los pacientes pediátricos.

8.2.5 Efectos adversos relacionados con el TES

El TES es un tratamiento seguro y con escasos efectos adversos. En la mayoría de los casos se reducen a reacciones alérgicas leves y la producción de anticuerpos (IgG) anti-alglucerasa o anti-imiglucerasa con una frecuencia de 40 y 20%, respectivamente (406). En alguna ocasión se ha documentado la disminución de la respuesta al TES y reactivación de la sintomatología coincidiendo con la aparición de anticuerpos anti-alglucerasa (423). Sin embargo recientemente se ha comprobado que aunque un porcentaje elevado de pacientes presenta anticuerpos durante el tratamiento, el 90% de ellos se hacen tolerantes con el tiempo (424). Sólo existe un caso comunicado de reacción anafilactoide a imiglucerasa con test de degranulación de mastocitos positivo pero con IgG anti-alglucerasa indetectable. Este paciente toleraba la administración de alglucerasa (425).

Otros efectos secundarios propios de la alglucerasa obtenida de placentas, dependían de las impurezas hormonales dando lugar a fenómenos de virilización leves y teóricamente al empeoramiento del cáncer de próstata. En la actualidad con el empleo de la imiglucerasa estos efectos quedan totalmente soslayados (26).

8.3 Tratamiento anti-sustrato

La inhibición de la formación del sustrato glucosilceramida es una nueva terapia que aunque sugerida por Radin (426) en 1987 es presentada su utilización en un ensayo clínico por primera vez en 2000 por el grupo de Cox (28). El objeto es reducir la formación de glucoesfingolípidos a niveles en los que la actividad enzimática residual del paciente pueda catabolizar el sustrato. El iminoazúcar, N-butildeoxinojirimicin (OGT 918) es un inhibidor de la glucosiltransferasa que inicia la biosíntesis de la

formación de los glucocerebrósidos. Este tratamiento se ha convertido en una posible terapia en otras esfingolipidosis donde el tratamiento enzimático sustitutivo todavía no es posible.

Durante su utilización por un año en un grupo de pacientes afectados de EG tipo 1 se evidenció una reducción significativa del volumen hepático y esplénico junto a una reducción de la actividad de QT en un 16.4%. Sin embargo no existía un incremento significativo en los niveles de hemoglobina y recuento plaquetario. Sin embargo este tratamiento ha despertado durante el último año una importante controversia. Los detractores del mismo consideran que existe una significativa discordancia entre la reducción significativa de visceromegalias y la ausencia de respuesta hematológica. Además la reducción de la actividad de QT aunque significativa es bastante pobre; claramente menor que la reducción existente durante el primer año de TES (427,428). Incluso es contradictorio el hecho de que la mayor reducción de las visceromegalias acontezca en los 6 primeros meses mientras que la actividad de quitotriosidasa en ese momento sólo se ha modificado en un 5%. Posiblemente esta reducción de las visceromegalias pueda ser resultado no de la disminución del número de células de Gaucher sino de una posible atrofia inducida por el propio OGT 918. Otro inconveniente notable es la aparición de efectos adversos, principalmente diarrea que obligó a varios pacientes a dejar el tratamiento. Además en dos casos aparecieron parestesias. Todo ello obliga a ser muy cautos en la utilización de esta nueva terapia y en su posible combinación con el TES ya que podría añadir confusión.

8.4 Transplante de precursores hematopoyéticos

Con el transplante de precursores hematopoyéticos lo que se intenta es la sustitución de los macrófagos tisulares y circulantes, el aporte del enzima deficitario y facilitar el aclaramiento y eliminación del sustrato acumulado. En la EG se ha utilizado con este objetivo el transplante alogénico (429,430), mientras que el transplante autólogo queda reservado para la introducción de vectores de transducción en procedimientos de terapia génica (27,430). En primer lugar para la realización de un transplante es preciso disponer de un donante, generalmente un hermano, con idéntico HLA y una actividad enzimática adecuada. Existe la posibilidad de donantes no familiares HLA idénticos, pero existe un mayor riesgo de enfermedad injerto contra huésped. En pacientes pediátricos puede ser de utilidad como fuente de células pluripotenciales la sangre de

- INTRODUCCIÓN -

cordón (431). Como en otras situaciones el trasplante va a precisar un acondicionamiento basado fundamentalmente en una mieloablación por quimioterapia o quimioradioterapia. Por consiguiente hasta que el injerto prenda el paciente va a precisar de importantes medidas de soporte. La mayoría de las series de trasplante de precursores hematopoyéticos en la EG contemplan la realización de esplenectomía previa, con objeto de eliminar una buena parte del acúmulo tisular esplénico en aquellos pacientes con esplenomegalia voluminosa. Para minimizar el riesgo infeccioso se prefiere la realización de esplenectomía parcial (432,433). Posteriormente y para prevenir la enfermedad injerto contra huésped es preciso una terapia inmunosupresora prolongada lo que puede limitar en gran medida la calidad de vida de los pacientes (431).

En 1988, Ringden (432) publica el primer caso de trasplante de precursores hematopoyéticos donde tras un seguimiento de 5 años se pudo evidenciar la eficacia del procedimiento. En una serie de 6 casos del mismo grupo (434) se constató un aumento de la actividad de la enzima a los 30 días del trasplante. Los niveles de glucosilceramida se normalizaron al año en los casos que recibieron el trasplante de un donante enzimáticamente normal; sin embargo aquellos casos que lo recibieron de donantes heterocigotos para una mutación de la EG persistían niveles elevados a los 4-5 años. La afectación esquelética no se modificó, sin embargo tampoco existió progresión de la misma. Este hecho se confirma también en la serie de once casos del Westminster Children's Hospital (435). A nivel hepático el aclaramiento de las células de Gaucher es incompleto, permaneciendo las mismas en los espacios porta durante años, lo que sugiere el carácter avascular de estos espacios que harían imposible la eliminación del enzima a ese nivel de manera similar a lo que parece acontecer en el sistema nervioso central (430).

En resumen se puede señalar que el trasplante de precursores hematopoyéticos consigue unos niveles enzimáticos suficientes para modificar el curso evolutivo de la enfermedad, consiguiéndose una regresión de las visceromegalias e incluso en ocasiones la desaparición de las mismas. No sucede lo mismo en relación a la enfermedad ósea si bien ésta no progresa (434,435). Se ha comprobado como en pacientes transplantados existe un descenso de la actividad de quitotriosidasa en mayor

cuantía que con el TES (348). Sin embargo teniendo en cuenta criterios de riesgo / beneficio este tratamiento es cuestionable (431).

8.5 Terapia génica

Las enfermedades de depósito lisosomal son excelentes candidatos para ser abordadas mediante terapia génica por sus características fisiopatológicas, teniendo en cuenta que los receptores manosa-6-fosfato (M-6-P) independientes de cationes permiten la entrada de estas enzimas en el lisosoma desde el espacio extracelular (436). Por tanto, la elevación de los niveles plasmáticos de un enzima lisosomal que esté correctamente glicosilado (con restos M-6-P) permitirá que dicho enzima sea captado a distancia por células que tengan receptores M-6-P, entre en los lisosomas de estas células y lleve a cabo su función.

Estudios *in vitro* y en animales han puesto de manifiesto la posibilidad de transferir el gen que codifica un enzima a un tejido apropiado para que éste secrete el enzima al torrente circulatorio. Los estudios realizados en aquellas enfermedades lisosomales sin afectación neurológica para las que existe un modelo animal adecuado, se han basado en las siguientes estrategias:

1- La implantación de organoides: los fibroblastos cutáneos son cultivados y transducidos *ex vivo* con vectores retrovirales. Los clones productores del enzima son expandidos e incluidos en una matriz de colágeno que se implanta intraperitonealmente, de forma que es revascularizada *in vivo* y comienza a secretar altas cantidades del enzima correspondiente (437).

2- Transferencia génica a la médula ósea: células progenitoras hematopoyéticas son transducidas por retrovirus, seleccionadas y autotransplantadas, generando una población de células sanguíneas que expresan el transgén (438).

3- La transferencia génica al músculo: similar a la anterior. Mioblastos obtenidos por biopsia son transducidos con retrovirus y reimplantados en el músculo, donde se fusionan con las fibras musculares existentes. Una vez ahí el gen se expresará y producirá el enzima correspondiente, que se secretará gracias a la buena vascularización del tejido muscular. Además las fibras musculares tienen una vida media muy larga por

lo que el gen transferido puede prolongarse durante meses tras una sola intervención terapéutica (439).

En el caso de enfermedades lisosomales con afectación neurológica como ocurre en la EG neuronopática los niveles plasmáticos del enzima tras estos procesos de terapia génica son insuficientes desde un punto de vista terapéutico. Este problema ha sido atacado mediante la implantación intracerebral de células neurales transducidas con el gen terapéutico (440).

La gran mayoría de las estrategias en terapia génica ensayadas hasta el momento van encaminadas a la introducción del gen de la glucocerebrosidasa en los precursores de macrófagos. Para esto células madre hematopoyéticas procedentes de la médula ósea o de sangre periférica son transducidas ex vivo con retrovirus, y los clones que expresan glucocerebrosidasa son seleccionados y autotransplantados al mismo sujeto (441,442). Se comenzaron tres ensayos clínicos en fase 1 para el tratamiento de la EG utilizando esta metodología cuyos resultados han sido dispares: dos estudios fueron terminados al no demostrarse transducción eficaz de células CD34+, mientras el tercer ensayo ha dado resultados esperanzadores y sigue abierto (27). Mediante una estrategia ex vivo transplantando mioblastos singénicos modificados genéticamente, un estudio reciente ha demostrado la producción y secreción de glucocerebrosidasa humana en ratones y la captación del enzima por macrófagos hepáticos y de la médula ósea. Esto abre una nueva vía para el tratamiento de esta enfermedad mediante terapia génica (443).

9. PECULIARIDADES DE LA EG EN LA INFANCIA

Se deben establecer una serie de consideraciones especiales en relación a este grupo debido a que incluye niños con EG tipo 2 y 3 y EG tipo 1 severa. Como ya se ha señalado la edad media de presentación de la enfermedad tipo 2 es alrededor de los 3 meses generalmente con hepatoesplenomegalia y fallo de medro. A los 6 meses aparecen las complicaciones neurológicas con signos indicativos de daño de los núcleos de los nervios craneales y del sistema piramidal (278). La disfagia y el acúmulo de secreciones habitualmente conducen a neumonitis por aspiración. En ocasiones pueden aparecer convulsiones. La muerte suele tener lugar como consecuencia de episodios de apnea o neumonías por aspiración a una edad media de 9 meses, oscilando entre 1-24 meses. Es importante señalar que algunos niños con EG tipo 1 pueden debutar antes de

- INTRODUCCIÓN -

los 2 años con una rápida progresión de la hepatoesplenomegalia y enfermedad ósea. Algunos de estos casos han sido incorrectamente clasificados como EG tipo 3. Es esencial documentar la existencia de afectación del sistema nervioso central antes de establecer dicho diagnóstico (245). El genotipo puede aportarnos importante información, ya que por ejemplo la presencia de la mutación N370S descarta la posible aparición de clínica neurológica (444). En la EG tipo 3 la hepatoesplenomegalia generalmente precede a la clínica neurológica, que aparece a una edad más tardía que en la tipo 2, además de tener una evolución más lenta. En la población Norrbottnian la edad media de presentación era alrededor de 2 años con un rango de 6 meses y 14 años (445). Las anomalías neurológicas en la EG tipo 3 incluyen ataxia, paraparesia espástica, crisis convulsivas, demencia pero principalmente oftalmoplejia supranuclear (278).

En la historia clínica de un niño con EG se debe prestar atención tanto a las manifestaciones directas como indirectas. Las primeras harán referencia a los efectos de las visceromegalias, enfermedad ósea, sangrado, tendencia a las infecciones, afectación pulmonar y enfermedad neurológica. Sin embargo existen un número de manifestaciones indirectas que también nos informan del grado de gravedad de la enfermedad. Estas incluyen el retraso de crecimiento, malnutrición, en ocasiones retraso psicomotor, pubertad retrasada y bajo rendimiento escolar. De estas manifestaciones como se ha señalado el retraso de crecimiento parece tener un papel importante en la determinación de gravedad así como en el grado de progresión de la enfermedad en la infancia (245). Hasta un 50% de los niños con EG presentan retraso de crecimiento que además se relaciona con la gravedad de la enfermedad medida por otros parámetros. El retraso de crecimiento se corrige con el TES (262). En algunos niños, en nuestra experiencia en un porcentaje elevado, puede ser la única manifestación de la enfermedad. Lo mismo que en el adulto existen intentos para establecer un estadiaje de gravedad pero hay dificultades prácticas, por ejemplo en la evaluación mediante resonancia magnética. En el seguimiento de estos pacientes es necesario establecer controles analíticos (recuentos hematológicos, coagulación, función hepática, fosfatasa ácido tartrato resistente, vitamina D, QT), mediciones antropométricas regulares y estimación del tamaño visceral mediante ecografía. En los niños afectados de formas neuronopáticas se debe considerar la posibilidad de realizar resonancia magnética cerebral y electroencefalogramas (245).

- INTRODUCCIÓN -

El TES es muy efectivo en el control de las manifestaciones en los niños afectados de EG tipo 1 (245). La indicación del TES ofrece menos dudas en la infancia que en la edad adulta. Se indica sin excepción en todos los pacientes tipo 1 y 3 sintomáticos, pero también en aquellos asintomáticos donde los parámetros antropométricos indican retraso de crecimiento. Los niños asintomáticos son diagnosticados en muchas ocasiones en estudios familiares cuando un hermano o un padre presenta la enfermedad. En estos casos se puede indicar el tratamiento en el niño asintomático si es heteroalélico para mutaciones que se asocian con enfermedad rápidamente progresiva: N370S con L444P, 84GG o IVS2+1 (168). En un niño asintomático homocigoto para la mutación N370S sino existe compromiso del crecimiento se puede adoptar una política expectante. En la enfermedad tipo 3 como se ha señalado el TES revierte la sintomatología visceral y hasta cierto punto la enfermedad ósea, siendo más discutible el control de la clínica neurológica. El empleo de dosis elevadas (120-240 U / kg / mes) podría detener la progresión de la enfermedad neurológica (419-421). En la enfermedad tipo 2 el TES ha resultado ineficaz, probablemente en el futuro el empleo de iminoazúcares que bloquean la síntesis de glucosilceramida y atraviesan la barrera hematoencefálica pueda proporcionar una alternativa en estos pacientes (446).

El TES en los pacientes pediátricos se debe iniciar con una dosis de 60 U / kg / 2 semanas. En algunos casos puede ser útil la utilización de reservorios permanentes para su administración. Es importante evaluar no solo los parámetros clínicos-analíticos clásicos de respuesta al tratamiento sino también y posiblemente con mayor énfasis la evolución antropométrica y el desarrollo de la pubertad (262). Es importante mantener de forma prolongada la utilización de dosis elevadas, porque una reducción podría suponer un riesgo mayor de recurrencia de crisis óseas y consecuencias definitivas sobre el crecimiento (245).

OBJETIVOS

- OBJETIVOS -

OBJETIVOS:

1. Analizar los factores relacionados con el crecimiento en pacientes menores de 14 años comparando los resultados con la población normal y las variaciones producidas en el eje GH-IGF antes y después de 2 años en TES.
2. Evaluar en la cohorte seleccionada los indicadores del crecimiento somático.
3. Analizar las características clínicas, analíticas y genéticas de la Enfermedad de Gaucher con inicio en edad pediátrica.
4. Estudiar la respuesta clínica y analítica al tratamiento enzimático sustitutivo en dicha población.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

Se han recogido los datos clínicos, analíticos, enzimáticos y genéticos de un total de 50 pacientes españoles afectados de EG con diagnóstico de la enfermedad antes de los 14 años de edad. Para ello se han utilizados los datos del Registro Español de EG (REEG).

- Información clínica: Se obtuvo mediante la utilización de cuestionarios estandarizados remitidos a los médicos (pediatras, hematólogos e internistas) que aportaron información clínica actualizada sobre sus pacientes (ver anexo con los cuestionarios).

- Información analítica: Los médicos responsables de los pacientes han suministrado los datos correspondientes a la analítica incluyendo parámetros hematológicos y bioquímicos elementales; utilizándose como valores de referencia los propios de cada uno de los hospitales. Para la determinación de la actividad de β -glucosidasa ácida, quitotriosidasa y análisis molecular se remitieron muestras de sangre mediante mensajería urgente, en tubos de EDTA, debidamente etiquetada y conservada a 4° C, al Laboratorio de Lípidos del Departamento de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza. En las 24 horas siguientes a la extracción se realizó el procesamiento y numeración de las muestras, así como el ensayo enzimático y la extracción del DNA. Un 6% de los pacientes incluidos fueron estudiados en otro laboratorio de referencia acreditado.

El diagnóstico se estableció mediante al menos dos de los siguientes tres métodos: demostración histológica de células de Gaucher típicas en médula ósea, actividad de β -glucosidasa ácida disminuida (menor del 10% de los valores de normalidad) y caracterización molecular de un genotipo asociado a EG (cuando ambos alelos mutados eran identificados).

En aquellos casos en que fue solicitado se realizaron estudios familiares (actividad de β -glucosidasa ácida y quitotriosidasa, análisis molecular y estudio del perfil lipídico).

- MATERIAL Y MÉTODOS -

- Requisitos formales:

. El protocolo establecido era conforme a las directivas del Comité Ético del Hospital Miguel Servet de Zaragoza y de la revisión de 1983 de la Declaración de Helsinki de 1975.

. De todos los pacientes (y/o de sus representantes legales) y de sus familiares estudiados se obtuvo consentimiento informado escrito.

1.1 Diseño del estudio

Estudio observacional retrospectivo – prospectivo de cohorte con seguimiento mediante encuesta y determinaciones analíticas.

1.1.1 Aspectos demográficos

Población: - 50 pacientes afectos de EG

- 75 familiares:

.57 individuos portadores

.18 no portadores

En la cohorte de pacientes se estableció su distribución porcentual por procedencia geográfica, sexo, grupos de edad al diagnóstico (<1 año, 1-5 años, 5-10 años, 10-14 años) y subtipo de EG (1,2 y 3). Los subtipos fueron establecidos en función de la ausencia de manifestaciones neurológicas o en relación con el comienzo y gravedad de la sintomatología neurológica. Así mismo se clasificaron los pacientes según el índice de gravedad de Zimran (SSI y SSIA).

1.1.2 Variables

- ***Clinicas***: edad de inicio de la sintomatología / edad de diagnóstico, tamaño hepático y esplénico (centímetros bajo reborde costal medido por ecografía), crisis óseas, alteraciones óseas mediante técnicas de imagen (radiología simple y resonancia magnética) incluyendo lesiones líticas, osteopenia, fracturas, infartos, necrosis avascular y deformidad en matraz de Erlenmeyer, manifestaciones neurológicas, oculares y dermatológicas. En una segunda fase se solicitó de aquellos pacientes todavía en fase de crecimiento la talla al inicio del TES y durante el seguimiento del mismo.

- MATERIAL Y MÉTODOS -

Se establecieron controles de estos parámetros clínicos al inicio, a los 3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses del tratamiento.

- **Análíticas:** hemoglobina (g/dL), recuento plaquetario ($\times 10^9/L$) y leucocitario ($\times 10^9/L$), función hepática (AST (UI/L), ALT (UI/L), GGT (UI/L)), perfil lipídico (colesterol total (mg/dL), HDL colesterol (mg/dL), LDL colesterol (mg/dL), triglicéridos (mg/dL)), fosfatasa ácida tartrato resistente (UI/L), actividad de β -glucosidasa ácida (nM/mg prot.h) y actividad de quitotriosidasa (nM /mL.h).

Los datos analíticos se recogieron antes de iniciar TES, a los 3, 6, 12, 18, 24 y 36 meses del tratamiento.

Se analizó el perfil lipídico en un grupo de 42 familiares sanos (21 individuos portadores y 21 no portadores) determinando colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol y triglicéridos. En 75 familiares sanos (57 individuos portadores y 18 no portadores) se determinó la actividad de β -glucosidasa ácida y actividad de quitotriosidasa.

En 22 pacientes se realizaron determinaciones de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs), concretamente IGF-1 total, IGF-1 libre, su proteína transportadora IGFBP-3 y la subunidad ácido lábil total (ALS) antes y durante los dos primeros años de tratamiento.

- **Genéticas:** Se ha clasificado a los pacientes según el tipo de mutación detectada. Así mismo el estudio familiar permitió diferenciar el grupo de portadores del grupo de individuos no portadores de la mutación.

2. MÉTODOS

Como se ha señalado previamente los datos demográficos, antropométricos, clínicos y bioquímicos habituales fueron obtenidos a partir del cuestionario remitido por la FEETEG. El estudio enzimático (determinaciones de actividad de glucocerebrosidasa y quitotriosidasa) así como el estudio genético se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza. El perfil lipídico fue determinado en dicho laboratorio en el 90% de los pacientes y en sus

familiares (portadores y no portadores). La determinación de IGFs y sus proteínas transportadoras se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina Nuclear y de ALS total en el Laboratorio de Bioquímica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, en muestras plasmáticas previamente congeladas a -80°C en el Departamento de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias.

A continuación se expondrá el procedimiento utilizado en la obtención de leucocitos, determinación de actividad de β -glucosidasa ácida y quitotriosidasa, estudio genético y por último determinación de IGFs y sus proteínas transportadoras.

2.1 Obtención de leucocitos

Debido a que dentro de las líneas celulares presentes en la sangre periférica únicamente los leucocitos presentan núcleo, éstas son las células necesarias para poder realizar el análisis enzimático y molecular de los pacientes.

Para poder extraer los leucocitos, primero se separa los elementos formes del plasma por medio de centrifugación. En pasos sucesivos, y aprovechando los distintos pesos moleculares de las células componentes de la sangre, se va a poder obtener un “pellet” de leucocitos por medio de centrifugación y resuspensiones sucesivas.

Para ello se cogió 4 ml de dextrano 6% en salino con una jeringuilla de 20 ml y se añadieron 14 ml de sangre con EDTA, teniendo cuidado de no formar burbujas. Se invirtió la jeringuilla unas 10 veces y se colocó en una gradilla con la aguja hacia arriba. Se dejó decantar durante unas 2 horas. A continuación se quitó la aguja y se limpió con agua; se limpió también la boca de la jeringuilla con papel absorbente y se dobló la aguja con unos alicates.

El siguiente paso fue decantar el sobrenadante de color pajizo, que contenía linfocitos y algunos hematíes, en tubos falcom de 15 ml, presionando la jeringuilla invertida que tenía la aguja curvada hacia abajo. Se centrífugo a 2000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante a lejía; se resuspendió el “pellet” en 1 ml de NaCl 0.9% mediante succión con una pipeta Pasteur. Se añadieron 5 ml de NH_4Cl 0.83% a temperatura ambiente y se mezcló bien dejando reposar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Nuevamente se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Se obtuvieron tres fases: un sobrenadante rojizo, una banda de restos de hematíes y un “pellet” de leucocitos. Se resuspendió la banda de hematíes en el líquido superior con una pipeta de Pasteur y se decantó el sobrenadante. Si el “pellet” no estaba limpio de hematíes se resuspendía en 5 ml de NaCl 0.9% con una pipeta Pasteur y centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se resuspendía la banda de hematíes como anteriormente. Si el “pellet” estaba limpio de hematíes se resuspendía en 3 ml de NaCl 0.9% con una pipeta Pasteur, y repartido en tres tubos eppendorfs. Seguidamente se centrifugó en la microcentrífuga a 11000 rpm durante 30 segundos, se decantó el sobrenadante. Los “pellet” fueron congelados a -20°C para el posterior uso.

2.2 Medición de la actividad de β -glucocerebrosidasa ácida

El fundamento del mismo ha sido suficientemente expuesto en la Introducción.

Para su determinación se resuspendió el “pellet” de leucocitos en 400 μl de taurocolato sódico 1% con la pipeta y fueron pasados a un tubo “falcon” de 15 ml enfriado previamente en hielo. Se preparó una disolución de sustrato 4-MU-Glc a una concentración final de 5.41 mg/ml. Este sustrato se disolvió sonicando durante 15 minutos y enfriando el recipiente en hielo.

Los extractos celulares se sonicaron durante 30 segundos, 10 segundos y 10 segundos, y fueron enfriados en hielo durante 30 segundos entre periodo y periodo. Posteriormente se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf. Se determinó la concentración de proteínas del extracto utilizando el método de Bradford, usando como estándares disoluciones del albúmina bovina. Una vez calculada la concentración de proteínas de cada muestra, se prepararon 150 μL de una solución 1 mg/mL de proteína en taurocolato sódico 1%.

Al sustrato sonicado le fue añadido el mismo volumen de la solución tampón citrato-fosfato (pH=5) + taurocolato sódico 2% + Tritón X-100 1%, y se incubaron por duplicado durante 2 horas a 37°C . Posteriormente se realizaron las medidas de las lecturas y se calcularon los nmoles/mg de proteína x hora producidos.

2.3 Medición de la actividad enzimática de la Quitotriosidasa

El fundamento es el mismo que para la medición de la actividad de glucocerebrosidasa. En este caso el sustrato artificial utilizado es el 4-MU-Quitotriósido y la determinación se realiza en el plasma. Para facilitar los cálculos se realizan diluciones del plasma de los pacientes debido a la elevada actividad enzimática que presentan éstos.

Se preparó una dilución de 4-MU-Quitotriósido con tampón citrato-fosfato a un pH de 5.2 para tener una concentración de 0.022 mM y se añadieron 100 µl de esta solución, por duplicado para cada muestra, a tubos de polipropileno de 5 ml. Se pusieron a calentar a 37°C durante 5 minutos. Mientras tanto se realizó una dilución 1/50 de cada una de las muestras de plasma de los sujetos con EG: 10 µl de plasma + 490 µl de agua destilada. A cada uno de los tubos con el sustrato se le añadieron 5 µl de plasma, normal en el caso de sujetos sanos y plasma diluido en el caso de los pacientes, y se dejaron incubar a 37°C durante 15 minutos. A continuación se paró la reacción añadiendo 2 ml de 0.3 M glicina NaOH pH = 10.6 y se midió la fluorescencia de la 4-M-umbeliferona con una excitación de 366 nm y una emisión de 446 nm. Se realizaron las medias de las lecturas y se calcularon los nmoles/mL x hora para cada una de las muestras al multiplicar los nmoles obtenidos por 5 µl de plasma por 800.

2.4 Análisis de mutaciones

Se aisló el DNA de los pacientes a partir de leucocitos siguiendo métodos standard (447). Fueron amplificadas por medio de PCR aquellas zonas o fragmentos del gen de la β-glucocerebrosidasa ácida que, según la literatura y experiencia previa, eran subsidiarias de poseer una de las nueve mutaciones más frecuentes responsables de la enfermedad de Gaucher (N370S, L444P, D409H, R463C, P415R, 84GG, IVS2+1, delección 55pb, G377S). Así tras la PCR se utilizaron los enzimas de restricción XhoI (N370S), NciI (L444P), StyI (D409H), MsPI (R463C), HhaI (P415R), BsaBI (84GG), pI (IVS2+1), PvuII (G377S) (448,449). Las recombinaciones mayores del gen de la glucocerebrosidasa fueron determinadas mediante el procedimiento descrito por Beutler (450).

En el caso de no encontrarse ninguna de las mutaciones “comunes”, se diseñó una estrategia basada en la realización de técnicas de búsqueda como la amplificación de todo el gen de la glucocerebrosidasa (para descartar grandes deleciones) y SSCP (Polimorfismos de Conformación de Cadena Sencilla) (451) (y secuenciación. Para la técnica SSCP se utilizó un secuenciador automático ALF-Express, el cual posee un láser que va a ser barrido por el DNA que atraviesa un gel fabricado con y sin glicerol. El barrido del láser va a ser interpretado por un programa de ordenador conectado al secuenciador, dando un patrón de bandas que se debe comparar con el control. Cuando se observa un patrón anómalo se debe caracterizar la posible mutación mediante secuenciación de dicho fragmento. La secuenciación se realizó mediante el método enzimático descrito por Sanger o método de los di-deoxinucleótidos (452).

Respecto a la quitotriosidasa se estudiaron las mutaciones en el gen de la quitotriosidasa ya que el 6% de la población normal no tiene expresión de quitotriosidasa por ausencia del gen y este hecho produce la existencia de un 30-40% de portadores de este defecto.

2.5 Determinación de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) y sus proteínas transportadoras

IGF-1 total

Su determinación se llevó a cabo mediante una técnica inmunoradiométrica utilizando el kit DSL-2800 ACTIVE™ IGF-1 de DSL® (Diagnostic System Laboratories). El procedimiento para su determinación está basado en la descripción de Miles (453). Esta técnica es una determinación no competitiva donde la proteína que va a ser analizada queda dispuesta entre dos anticuerpos. El primer anticuerpo se encuentra fijado a la pared interior del tubo. El segundo anticuerpo es marcado para su detección. El coeficiente de variación interensayo e intraensayo de esta técnica es menor del 9% y 6% respectivamente.

IGF-1 libre

Su determinación se llevó a cabo mediante una técnica inmunoradiométrica utilizando el kit DSL-9400 ACTIVE™ Free IGF-1 de DSL® (Diagnostic System Laboratories). Este kit utiliza un método altamente sensible que permite la detección de niveles extremadamente bajos de IGF-1 libre, permitiendo medir la fracción disociable del IGF-1. Esta técnica es una determinación no competitiva donde la proteína que va a ser

analizada queda dispuesta entre dos anticuerpos. El primer anticuerpo se encuentra fijado a la pared interior del tubo. El segundo anticuerpo es marcado para su detección. El coeficiente de variación interensayo e intraensayo de esta técnica es del 9.9% y 10.1% respectivamente.

IGFBP-3

Su determinación se llevó a cabo mediante una técnica inmunoradiométrica utilizando el kit DSL-6600 ACTIVE™ IGFBP-3 de DSL® (Diagnostic System Laboratories). El procedimiento para su determinación está basada en la descripción de Miles (453). Esta técnica es una determinación no competitiva donde la proteína que va a ser analizada queda dispuesta entre dos anticuerpos. El primer anticuerpo se encuentra fijado a la pared interior del tubo. El segundo anticuerpo es marcado para su detección. El coeficiente de variación interensayo e intraensayo de esta técnica es del 1.9% y 3.9% respectivamente.

ALS total

Su determinación se realizó mediante técnica de ELISA utilizando el kit DSL ACTIVE™ total ALS de DSL® (Diagnostic System Laboratories). Los coeficientes de variación interensayo e intraensayo descritos son de 12.1% y 8.6% respectivamente (454).

2.6 Genes relacionados con el crecimiento y expresión alterada

En dos pacientes adultos, el primero de 48 años, mujer, N370S/T134P, SSIA 14 y esplenectomizada y VHC+; el segundo de 37 años, varón, N370S/N370S, SSIA 4 y no esplenectomizado se analizó la expresión génica en muestras de biopsia hepática utilizando el biochip Genechip de Affymetrix U95av que tiene todos los genes humanos conocidos hasta la fecha (n=12599). Como grupo control se utilizaron las muestras de biopsia hepática realizadas en 4 pacientes con litiasis biliar con hígado sano. En relación con el crecimiento hemos recogido aquellos genes responsables de proteínas relacionadas directamente con el crecimiento y diferenciación celular cuya expresión se encontraba reprimida.

La mayoría de los procesos fisiológicos y patológicos están regulados a través de la modulación de la expresión génica. Las células normalmente responden a un estímulo

- MATERIAL Y MÉTODOS -

externo, induciendo la expresión de determinados genes y reprimiendo la expresión de otros. En la mayoría de los procesos patológicos más de un gen está expresado diferencialmente; decenas, cientos, incluso miles de genes, pueden estar implicados en la regulación del proceso, aunque este número no suele ser demasiado alto.

La tecnología de DNA chips, que recientemente se ha desarrollado (455,456,457,458,459), permite detectar los cambios de expresión de cientos, incluso miles, de genes simultánea y cuantitativamente, con gran sensibilidad y especificidad. Cada DNA chip de expresión contiene sondas de DNA complementario (cDNA) correspondientes a los genes que queremos analizar.

Estos DNA chips se hibridan con los cDNAs sintetizados a partir de los mRNAs extraídos del tejido que queremos analizar. Estas moléculas de cDNA han sido marcadas con un fluoróforo al sintetizarse; cuanto mayor sea el número de moléculas que se unen a su secuencia complementaria en el chip, mayor será la cantidad de cromóforo que se detecta y mide tras excitarlo con un láser. Esta medida es por tanto reflejo del número de moléculas de cada mRNA que había en el tejido analizado y por tanto reflejo del nivel de expresión de cada gen representado en el chip. Estos chips de expresión contienen también sondas que representan genes de control (house-keeping genes), lo que permite normalizar los resultados y comparar múltiples experimentos de forma cuantitativa.

La compañía Affymetrix tiene comercializados diversos “biochips” para analizar estudios de expresión.

Para el estudio de expresión hepática se eligió el Genechip U95av que contiene hibridados oligonucleótidos de todas las secuencias que se corresponden a genes conocidos humanos. El análisis de estos biochips de la casa Affymetrix requiere disponer de un laboratorio especializado que disponga del aparataje que recomienda Affymetrix: “Fluidics estation”, “scanner” y “software” adecuado. Por ello el análisis de las biopsias hepáticas se llevaron a cabo en la empresa de biotecnología MedPlant de Barakaldo (Vizcaya).

Obtención de la biopsia

Se realizó obtención de la biopsia hepática mediante aguja hipodérmica. La muestra se introdujo en un tubo criogénico y se congeló inmediatamente en N₂ líquido y posteriormente se guardó a -80°C hasta el momento de la extracción del RNA.

Aislamiento del RNA total

El RNA total se obtuvo siguiendo el protocolo del reactivo comercial TRIzol (TRIzol Reagent, Gibco BRL Life Technologies, P/N 15596-018).

Una vez se obtuvo el RNA total este se limpió utilizando el protocolo del kit RNeasy Mini de QIAGEN.

Posteriormente se transformó en cDNA con ayuda de la enzima transcriptasa reversa y finalmente se marcó el cRNA con RNA polimerasa. El cRNA marcado se hibridó en el Genechip U95 av según protocolo de Affymetrix.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la realización de las bases de datos así como el análisis estadístico se utilizó ordenador PC, entorno Windows 98 y software Excel 2000 y SPSS 8.0, así como ordenador Macintosh con software Statview 4.1.

Se establecieron los siguientes tres apartados en relación a los objetivos propuestos:

3.1 Características clínicas, analíticas y genéticas de la población estudiada previo al inicio del tratamiento

3.1.1 Características demográficas

- Distribución porcentual por sexos y geográfica.
- Distribución por grupos de edad al diagnóstico.

3.1.2 Características clínicas

Se determinó:

- La distribución porcentual en tipos I, II y III de la enfermedad.

- MATERIAL Y MÉTODOS -

- Tamaño hepático y esplénico: Medido por ecografía y expresado en cm (media \pm desviación estándar), así como la frecuencia de presentación de hepatomegalia y esplenomegalia expresada en porcentaje. Igualmente se recogió el porcentaje de pacientes sometidos a esplenectomía.

Se analizaron las características diferenciales del grupo de pacientes que habían sido sometidos a esplenectomía en relación a los no esplenectomizados. Para ello se compararon las demás variables clínicas, analíticas y genéticas entre los dos grupos mediante test de la U de Mann-Whitney.

- Afectación ósea: Frecuencia expresada en porcentaje; así como sus distintas manifestaciones: frecuencia expresada en porcentaje de crisis óseas, deformidad en matraz de Erlenmeyer y complicaciones mayores (infartos, necrosis, fracturas,...).

- Otras manifestaciones: La frecuencia de afectación cutánea, ocular (presencia de pinguécula), pulmonar y neurológica, expresada en todos los casos en porcentajes en relación al grupo total.

3.1.3 Evaluación del crecimiento

- Se determinó el Z-score de talla medio en un grupo de 16 pacientes en crecimiento.

El Z-score de talla se calculó en cada caso mediante la fórmula:

$$\text{Z-score talla: } \frac{\text{Talla del paciente} - \text{Talla esperada}}{\text{Desviación estándar esperada}}$$

Donde talla esperada y desviación estándar esperada para la edad del paciente se obtuvieron a partir de los estándares de normalidad del Estudio Longitudinal de Crecimiento “Andrea Prader” del Gobierno de Aragón (D.G.A) (Figuras 6 y 7).

- Se analizó la asociación entre el Z-score de talla antes de iniciarse el tratamiento y los distintos parámetros clínicos, analíticos, enzimáticos y genéticos estudiados en la muestra. Se realizó análisis de correlación mediante test de Spearman y se determinaron las rectas de regresión con aquellas variables donde la correlación era significativa.

3.1.4 Características analíticas

1) Actividad de β -glucosidasa ácida (nM/mg.prot.h; media \pm desviación estándar) del grupo total.

Se determinó la actividad de β -glucosidasa ácida en familiares portadores y no portadores de una mutación del gen de la glucocerebrosidasa; estableciéndose comparación entre los tres grupos (pacientes, portadores y no portadores) mediante test de la U de Mann-Whitney. Así mismo se estableció en grado de solapamiento entre la actividad de β -glucosidasa ácida en individuos sanos portadores y no portadores (porcentaje de portadores en -1 SDS de los no portadores y no portadores en $+1$ SDS de portadores).

2) Presencia de alteraciones hematológicas:

a) Hemoglobina (g/dL; media \pm desviación estándar) del grupo total y el porcentaje de pacientes con niveles de hemoglobina inferiores a 11 gr/L.

b) Recuento plaquetario ($\times 10^9$ /L; media \pm desviación estándar) del grupo total y el porcentaje de pacientes con recuentos plaquetarios inferiores a 100×10^9 /l.

c) Recuento leucocitario ($\times 10^9$ /L; media \pm desviación estándar) del grupo total y el porcentaje de pacientes con recuentos leucocitarios inferiores a 5×10^9 /l.

3) Presencia de alteraciones de la función hepática:

a) AST (U/L; media \pm desviación estándar) del grupo total y el porcentaje de pacientes con niveles de AST mayores a 40 U/l.

b) ALT (U/L; media \pm desviación estándar) del grupo total y el porcentaje de pacientes con niveles de ALT mayores a 40 U/l.

c) GGT (U/L; media \pm desviación estándar) del grupo total y el porcentaje de pacientes con niveles de GGT mayores a 50 U/l.

- MATERIAL Y MÉTODOS -

4) Presencia de alteraciones en el perfil lipídico:

a) Colesterol total (mg/dL; media \pm desviación estándar) del grupo total y el porcentaje de pacientes con niveles de colesterol total menores a 120 mg/dl.

Igualmente se determinó colesterol total en un grupo de familiares portadores (n=21) y familiares no portadores (n=21) de los mismos pacientes.

Se estableció la posible existencia de diferencias estadísticas significativas en los niveles de colesterol en los tres grupos (pacientes, portadores y no portadores) mediante test de la U de Mann-Whitney.

b) HDL colesterol (mg/dL; media \pm desviación estándar) del grupo total y el porcentaje de pacientes con niveles de la fracción HDL colesterol menores a 35 mg/dl.

Igualmente se determinó HDL colesterol en un grupo de familiares portadores (n=21) y familiares no portadores (n=21) de los mismos pacientes.

Se estableció la posible existencia de diferencias estadísticas significativas en los niveles de la fracción HDL colesterol en los tres grupos (pacientes, portadores y no portadores) mediante test de la U de Mann-Whitney.

c) Triglicéridos (mg/dL; media \pm desviación estándar) del grupo total.

Igualmente se determinó triglicéridos en un grupo de familiares portadores (n=21) y familiares no portadores (n=20) de los mismos pacientes.

Se estableció la posible existencia de diferencias estadísticas significativas en los niveles de triglicéridos en los tres grupos (pacientes, portadores y no portadores) mediante test de la U de Mann-Whitney.

d) Índice aterogénico (IA) (media \pm desviación estándar) del grupo total. De los diferentes índices aterogénicos utilizados se eligió el cociente entre el Colesterol total y su fracción HDL.

- MATERIAL Y MÉTODOS -

Igualmente se determinó el IA en un grupo de familiares portadores (n=21) y familiares no portadores (n=21) de los mismos pacientes.

Se estableció la posible existencia de diferencias estadísticas significativas en el IA en los tres grupos (pacientes, portadores y no portadores) mediante test de la U de Mann-Whitney.

5) Marcadores enzimáticos de actividad de la enfermedad:

a) Fosfatasa ácida (U/L; media \pm desviación estándar) del grupo total.

b) Actividad de QT (nM/mL.h; media \pm desviación estándar) en un grupo de 33 pacientes antes de iniciarse el TES.

Se determinó igualmente la existencia de la duplicación responsable del déficit de Quitotriosidasa descrito en la población, estableciéndose un análisis comparativo de la actividad de QT entre los individuos portadores de la duplicación y aquellos sin afectación de ninguno de los alelos responsables de la síntesis de dicho enzima. Para ello se realizó test de la U de Mann-Whitney.

Se analizó la asociación entre la actividad de QT antes de iniciarse el tratamiento y los distintos parámetros clínicos, analíticos, enzimáticos y genéticos estudiados en la muestra. Se realizó análisis de correlación mediante test de Spearman y las correspondientes rectas de regresión lineal (en el grupo total, grupo portador de la duplicación y grupo no portador de la duplicación).

6) Análisis del sistema IGF-1/IGFBP-3/ALS

Se expresaron los niveles de IGF-1 total, IGFBP-3 e IGF-1 libre en SDS utilizando en el caso de IGF-1 total e IGFBP-3 los valores de normalidad estandarizados por edad y sexo de DSL[®] (Tablas 14,15,16,17, 18,19). En el caso de IGF-1 libre se utilizaron los valores de normalidad estandarizados por edad y sexo de J. Argente, V. Barrios (Hospital Niño Jesús, Madrid) (Tabla 20). ALS total se expresó en mcg/ml.

- MATERIAL Y MÉTODOS -

El SDS se calculó en cada caso mediante la fórmula:

$$\text{SDS IGF} = \frac{\text{IGF del paciente} - \text{IGF esperada}}{\text{Desviación estándar esperada}}$$

Donde IGF esperada y Desviación estándar esperada para la edad y sexo del paciente se obtuvieron a partir de los citados valores de normalidad.

- Se analizó la asociación entre IGF-1 total, IGF-1 libre, IGFBP-3 y ALS total antes de iniciarse el tratamiento y los distintos parámetros clínicos, analíticos, enzimáticos y genéticos estudiados en la muestra. Se realizó análisis de correlación mediante test de Spearman y se determinó las rectas de regresión lineal con aquellas variables en la que la correlación era significativa.

- Se determinó el score pronóstico de la enfermedad utilizando el SSI y SSIA de Zimran clasificando a los pacientes en 3 grupos; leve SSI 0-10; moderado SSI 11-25 y grave SSI >26 y se analizó su relación con el crecimiento.

7) Genes relacionados con el crecimiento y expresión alterada

En el Genechip U95av se han analizado los niveles de expresión hepática de todos los genes conocidos relacionados con el crecimiento en las dos muestras de pacientes con EG y se compararon con el “pool” de las biopsias hepáticas “control” de pacientes con litiasis biliar e hígado sano.

3.1.5 Características genéticas

Se estableció la distribución porcentual de los distintos genotipos presentes en la muestra así como las frecuencias alélicas (N370S, L444P, otras mutaciones detectadas y desconocidas).

Se analizó la influencia del genotipo en las características clínicas, analíticas, enzimáticas y relación con el crecimiento y los factores IGFs de los pacientes, por comparación de las mismas entre aquellos individuos portadores de la mutación L444P y los no portadores de dicha mutación mediante test de la U de Mann-Whitney. Así

mismo se analizó las diferencias entre los siguientes tres grupos: 1) Genotipo N370S/L444P; 2) N370S/otras y 3) otras / otras.

3.2 Respuesta al TES

3.2.1 Número de casos en tratamiento

Se estableció el porcentaje de pacientes con diagnóstico en edad pediátrica en tratamiento en el momento del estudio, su edad media al inicio del tratamiento (media \pm desviación estándar; así como el porcentaje de pacientes de cada grupo de edad (<5 años, 5-10 años, 10-14 años, 14-18 años y > 18 años) en relación al grupo total de pacientes que reciben TES. Igualmente se determinó el tiempo medio transcurrido de TES en la población española con EG de inicio en la edad pediátrica.

3.2.2 Respuesta en las visceromegalias

Se determinó el tamaño hepático y esplénico en los diferentes controles evolutivos antes citados; estableciéndose comparación entre el inicio del tratamiento y el año, 2 años y 3 años de tratamiento. Igualmente se analizó las modificaciones dentro del primer año de tratamiento al realizarse controles a los 3 y 6 meses. En el análisis estadístico se utilizó el test de Wilcoxon.

3.2.3 Respuesta del crecimiento

Se determinó en 15 pacientes la respuesta del crecimiento al TES con comparación del Z-score de talla antes y durante el TES (al año y 2 años) mediante test de Wilcoxon.

3.2.4 Respuesta hematológica

- Hemoglobina: Se determinaron los niveles de hemoglobina en los diferentes controles evolutivos antes citados; y en aquellos casos con niveles iniciales inferiores a 11 gr/L se estableció comparación entre el inicio del tratamiento y el año, 2 años y 3 años de tratamiento. Igualmente se analizó las modificaciones dentro del primer año de tratamiento al realizarse controles a los 3 y 6 meses. En el análisis estadístico se utilizó el test de Wilcoxon.

Igualmente se determinó el porcentaje de individuos que presentaban niveles de hemoglobina disminuidos en los distintos controles evolutivos estableciéndose comparación mediante test de Chi².

- MATERIAL Y MÉTODOS -

- Recuento plaquetario: Se determinaron los recuentos plaquetarios en los diferentes controles evolutivos antes citados; y en aquellos casos con recuentos iniciales inferiores a $100 \times 10^9 / l$ se estableció comparación entre el inicio del tratamiento y el año, 2 años y 3 años de tratamiento. Igualmente se analizó las modificaciones dentro del primer año de tratamiento al realizarse controles a los 3 y 6 meses. En el análisis estadístico se utilizó el test de Wilcoxon.

Igualmente se determinó el porcentaje de individuos que presentaban recuentos plaquetarios disminuidos en los distintos controles evolutivos estableciéndose comparación mediante test de χ^2 .

3.2.5 Cambios en el perfil lipídico

- Colesterol total: Se determinaron los niveles de colesterol total antes y durante el tratamiento (al año, 2 años y 3 años) estableciéndose la existencia de cambios significativos en sus niveles mediante comparación por test de Wilcoxon.

- HDL colesterol: Se determinaron los niveles de HDL colesterol antes y durante el tratamiento (al año, 2 años y 3 años) estableciéndose la existencia de cambios significativos en sus niveles mediante comparación por test de Wilcoxon.

-Índice aterogénico (IA): Se determinó el IA antes y durante el tratamiento (al año, 2 años y 3 años) estableciéndose la existencia de cambios significativos mediante comparación por test de Wilcoxon.

3.2.6 Respuesta de los marcadores enzimáticos de actividad

- Fosfatasa ácida: Se determinaron los niveles de fosfatasa ácida en los diferentes controles evolutivos antes citados; estableciéndose comparación entre el inicio del tratamiento y el año, 2 años y 3 años de tratamiento. Igualmente se analizó las modificaciones dentro del primer año de tratamiento al realizarse controles a los 3 y 6 meses. En el análisis estadístico se utilizó el test de Wilcoxon.

- Actividad de QT: Se determinó la actividad de QT en los diferentes controles evolutivos; estableciéndose comparación entre el inicio del tratamiento y el año, 2 años, 3 años y 4 años de tratamiento. Igualmente se analizó las modificaciones dentro

- MATERIAL Y MÉTODOS -

del primer año de tratamiento al realizarse controles a los 6 meses. En el análisis estadístico se utilizó el test de Wilcoxon.

Igualmente se estableció las modificaciones que experimentaba la actividad de QT en un grupo de 8 pacientes durante un año sin recibir TES.

3.2.7 Respuesta del sistema IGF-I - IGFBP-3 - ALS

Se evaluó la influencia del TES sobre los IGFs y sus proteínas transportadoras mediante comparación de sus niveles antes y durante el tratamiento (al año y a los 2 años) mediante test de Wilcoxon.

ANEXO

REGISTRO ESPAÑOL DE ENFERMEDAD

DE

GAUCHER

PROTOCOLO BASICO DE DATOS CLINICOS Y ANALITICOS

ZARAGOZA

- MATERIAL Y MÉTODOS -

Nombre del paciente: _____

REMITENTE :

Dra/Dr:	Especialidad:
Centro de trabajo (o domicilio):	
Dirección de contacto:	Tfno/Fax:
Áreas de interés en la enfermedad de Gaucher:	

PACIENTE (o familiar, especificar parentesco):

Nombre:					
Edad:	Fecha Nacimiento:	Al diagnóstico:		. Actual:	
Sexo	MF	Peso	___, ___ Kg	Talla	___, ___ cm

PERFIL CLINICO

1.-AFECTACION OSEA		
1º Manif. Posterior	Dolor óseo (cualquier localización): Crisis óseas Deformidad en matraz (Erlenmeyer) Osteomielitis Necrosis avascular Prótesis articulares Otros	
2.-AFECTACION VISCERAL		
	Hepatomegalia de cms ecográfica o expl. física Esplenomegalia de cms ecográfica o expl. física Afect. Pulmonar Cardíaca Sistema Nervioso Piel Conjuntivas (pingüeculas) Riñón Otras: ESPLENECTOMIA: Fecha:	
3.-ANTECEDENTES:		
Alcohol > 30 gr/día	Diabetes	Dislipemia
Fármacos:		

- MATERIAL Y MÉTODOS -

Nombre del paciente: _____

PERFIL ANALITICO:

BIOQUIMICA: expresar unidades					
GOT	-GPT	-Fosf Alcalina	-Fosf Acida Total	-Prostática	-GGT
Bilirr. Total	-Dir.	-Prot T	-Albúmina	-ECA	-Gluc
Colesterol Total	-HDL	-LDL	-Triglicéridos		
Apo A1	-Apo B				

HEMATIMETRIA:						
Hematies	Hb	Hto	VCM	HCM		
Leucocitos	T	-S	-L	-M	-E	-B
Plaquetas						

SEROLOGIA:		
VHB	VHC	VIH

OTRAS EXPLORACIONES:				
Rx ósea	TAC	RMN	Gammagrafia	Ecografia
DESCRIPCION:				

HISTORIA FAMILIAR:

ACTIVIDAD ENZIMATICA:

GENOTIPO:

TERAPIA ACTUAL:
Fecha inicio:
Dosis inicial/actual

- MATERIAL Y MÉTODOS -

Nombre del paciente: _____

EVOLUCION POSTRATAMIENTO CON ALGLUCERASA:

Fecha inicio: _____				
Dosis _____				
Hb: _____	Plaquetas	F.Acida:	Colesterol	
HDL: _____	LDL:			
Hígado (cm):		Bazo (cm):		Rx ósea:
(Volumen c.c.)		(Volumen c.c.)		RNM:

A los tres meses				
Dosis _____				
Hb: _____	Plaquetas	F.Acida:	Colesterol	
HDL: _____	LDL:			
Hígado (cm):		Bazo (cm):		Rx ósea:
(Volumen c.c.)		(Volumen c.c.)		RNM:
Anticuerpos anticeredase:				
Incidencias:				

A los seis meses				
Dosis _____				
Hb: _____	Plaquetas	F.Acida:	Colesterol	
HDL: _____	LDL:			
Hígado (cm):		Bazo (cm):		Rx ósea:
(Volumen c.c.)		(Volumen c.c.)		RNM:
Anticuerpos anticeredase:				
Incidencias:				

A los nueve meses				
Dosis _____				
Hb: _____	Plaquetas	F.Acida:	Colesterol	
HDL: _____	LDL:			
Hígado (cm):		Bazo (cm):		Rx ósea:
(Volumen c.c.)		(Volumen c.c.)		RNM:
Anticuerpos anticeredase:				
Incidencias:				

A los doce meses				
Dosis _____				
Hb: _____	Plaquetas	F.Acida:	Colesterol	
HDL: _____	LDL:			
Hígado (cm):		Bazo (cm):		Rx ósea:
(Volumen c.c.)		(Volumen c.c.)		RNM:
Anticuerpos anticeredase:				
Incidencias:				

CENTRO DE ESTUDIO LONGITUDINAL DEL CRECIMIENTO -ANDREA PRADER"

Talla Horizontal • Mujeres (cm.)

Ec	N	X	D.S.	SK	K	P3	P10	P25	P50	P75	P90	P97
0.00	167	49.86	1.49	-0.30	0.50	47.05	47.94	48.91	49.94	50.90	51.74	52.30
0.25	164	59.32	1.96	-0.58	0.89	54.79	56.59	58.21	59.52	60.36	61.56	62.46
0.50	161	65.79	2.05	-0.27	0.07	61.38	63.05	64.50	65.93	67.08	68.19	69.48
0.75	158	70.07	2.10	-0.28	0.03	65.17	67.28	68.62	70.26	71.39	72.73	73.83
1	156	73.68	2.17	0.10	-0.23	69.87	70.83	71.95	73.65	75.20	76.54	77.66
2	146	80.28	2.52	0.14	-0.05	75.35	76.99	78.63	80.10	81.85	83.48	84.98
2	139	86.24	2.86	0.11	-0.16	80.53	83.09	84.18	86.05	88.04	90.40	91.92
3	136	95.41	3.21	0.36	-0.20	89.66	91.36	92.92	95.40	97.10	99.62	102.24

Talla Vertical • Mujeres (cm.)

Edad (Años)	N	X	D.S.	COEFICIENTES		PERCENTILES						
				SK	K	3	10	25	50	75	90	97
2	133	86.07	2.84	0.11	-0.25	80.09	82.92	84.09	85.90	87.93	90.12	91.31
3	136	95.19	3.23	0.41	-0.14	89.66	91.23	92.89	95.06	97.29	99.81	102.30
4	133	102.93	3.50	0.21	0.07	96.13	98.56	100.46	102.77	105.25	107.56	109.55
5	126	109.63	4.03	-0.30	1.51	102.52	104.71	107.00	109.50	112.55	114.63	116.85
6	129	116.24	4.04	0.04	-0.25	108.48	111.20	113.10	116.40	119.25	122.00	123.33
7	124	122.09	4.31	0.15	-0.20	113.17	117.00	119.00	122.00	124.97	128.50	130.22
8	123	127.83	4.43	0.16	-0.34	118.94	122.58	124.50	127.70	130.90	133.92	137.19
9	123	133.26	4.88	0.23	-0.39	124.02	127.67	129.77	132.91	136.34	139.71	143.19
10	121	138.82	5.44	0.27	-0.21	128.61	132.47	135.05	138.47	142.43	145.28	149.51
11	121	144.94	5.87	0.15	-0.24	134.07	137.71	140.69	144.80	148.79	152.40	156.29
12	121	151.23	5.82	0.00	-0.27	140.61	143.32	146.83	151.59	155.09	158.10	162.73

Talla Horizontal • Varones (cm.)

Ec	N	X	D.S.	SK	K	P3	P10	P25	P50	P75	P90	P97
0.00	165	50.51	1.53	-0.07	0.33	47.49	48.02	49.90	50.46	51.49	52.12	53.10
0.25	161	61.00	2.21	0.05	0.40	57.13	58.28	59.60	60.90	62.13	64.07	65.31
0.50	161	67.82	2.39	-0.09-	-0.18	62.96	64.47	66.42	67.61	69.47	70.93	72.01
0.75	152	72.25	2.53	-0.28	-0.38	66.88	68.62	70.53	72.23	74.10	75.42	76.42
1	154	75.77	2.59	-0.01	0.50	70.62	72.61	73.94	75.78	77.35	78.96	80.03
2	145	82.28	2.82	0.34	0.36	77.23	78.36	80.41	82.17	83.78	85.47	87.62
2	131	88.17	3.13	0.25	0.59	82.47	83.51	85.87	88.05	90.14	91.89	94.03
3	137	97.09	3.61	0.13	0.38	89.92	92.08	94.82	96.95	99.27	101.39	103.34

Talla Vertical • Varones (cm.)

Edad (Años)	N	X	D.S.	COEFICIENTES		PERCENTILES						
				SK	K	3	10	25	50	75	90	97
2	126	87.93	3.13	0.26	0.45	82.20	84.17	85.64	87.87	90.00	91.72	93.90
3	137	96.78	3,48	0.16	0.85	90.51	92.21	94.66	96.82	99.16	101.07	102.65
4	134	104.27	4.09	-0.04	0.76	95.99	98.80	101.97	104.35	107.23	109.05	110.80
5	133	111.12	4,30	-0.56	0.49	102.60	105.20	108.60	111.30	114.10	116.16	119.46
6	136	117.61	4,74	-0.07	0.43	107.62	111.44	114.50	117.80	320.97	123.43	126.91
7	128	123.39	5.06	-0.10	0.69	112.06	116.70	120.15	123.50	126.97	129.51	133.41
8	128	128.92	5.40	-0.22	0.51	116.78	121.59	125.50	129,15	132.95	135.41	138.47
9	124	134.28	5.83	-0,01	0.42	122.38	126.13	130.31	134.40	138.20	140.92	145.23
10	121	139.77	6.16	-0.05	0.28	127.16	131.48	136.04	139.85	144.17	146.98	150.41
11	119	144.83	6.37	-0.08	0.19	132.46	135.46	141.17	145.26	149.05	152.13	155.86
12	121	150.09	7.13	-0.02	-0.35	138.17	140.07	145.59	149.90	155.43	159.27	162.39

N: número de casos. X: media. D.S.: desviación estándar. SK: skewness. K: kurtosis. P: percentil.

Tabla 14. IGF-1 total. Valores de normalidad 0-7 años.

Edad (años)	N	Media	SD
0-1	52	35.3	23.9
1-2	33	44.2	30.0
2-3	21	66.4	36.4
3-4	12	66.1	32.5
4-5	18	76.3	31.7
5-6	18	108.3	55.4
6-7	18	134.4	73.3

Ambos sexos combinados. DSL[®]. Unidades en ng/ml.

Tabla 15. IGF-1 total. Valores de normalidad. Varones.

Edad (años)	N	Media	SD
7-8	33	193.4	92.3
8-9	22	182.2	63.7
9-10	24	222.3	125.7
10-11	22	151.6	70.0
11-12	24	175.2	118.8
12-13	19	255.6	130.3
13-14	28	397.0	218.2
14-15	15	576.9	241.1
15-16	16	530.4	121.5
16-18	20	454.4	111.6
18-20	23	489.0	206.7
20-23	29	420.1	114.7
23-25	23	320.7	106.3
25-30	47	236.7	81.2
30-40	41	211.9	102.5

DSL[®]. Unidades en ng/ml.

Tabla 16. IGF-1 total. Valores de normalidad. Mujeres.

Edad (años)	N	Media	SD
7-8	20	205.0	111.9
8-9	12	275.3	96.1
9-10	21	277.6	119.6
10-11	21	307.3	158.7
11-12	17	358.2	186.0
12-13	21	444.9	226.4
13-14	26	489.0	165.0
14-15	18	499.3	135.9
15-16	21	494.2	142.7
16-18	21	436.9	120.8
18-20	15	367.9	106.1
20-23	25	288.9	109.8
23-25	19	274.9	93.1
25-30	45	253.5	106.6
30-40	24	217.7	76.2

DSL[®]. Unidades en ng/ml

Tabla 17. IGFBP-3. Valores de normalidad 0-7 años.

Edad (años)	N	Media	SD
0-1	49	1.96	0.54
1-2	42	2.15	0.64
2-3	28	2.23	0.60
3-4	18	2.31	0.78
4-5	23	2.36	0.45
5-6	19	2.67	0.55
6-7	22	2.92	0.61

Ambos sexos combinados. DSL[®]. Unidades en µg/ml.

Tabla 18. IGFBP-3. Valores de normalidad. Varones.

Edad (años)	N	Media	SD
7-8	35	2.50	1.08
8-9	22	3.53	0.66
9-10	25	3.69	0.79
10-11	26	3.38	1.08
11-12	26	3.50	0.87
12-13	27	3.78	0.99
13-14	27	4.46	1.11
14-15	20	4.65	1.52
15-16	19	4.61	1.49
16-18	22	4.62	1.29
18-20	22	4.93	1.21
20-23	31	4.64	1.02
23-25	22	4.25	0.90
25-30	52	3.64	0.95
30-40	43	3.44	0.85

DSL®. Unidades en µg/ml

Tabla 19. IGFBP-3. Valores de normalidad. Mujeres.

Edad (años)	N	Media	SD
7-8	21	4.06	1.13
8-9	17	3.92	0.83
9-10	25	4.44	1.02
10-11	24	4.11	1.11
11-12	20	4.77	1.44
12-13	23	4.71	1.69
13-14	32	4.31	1.22
14-15	24	4.37	1.08
15-16	23	4.44	0.94
16-18	24	4.31	1.08
18-20	21	4.43	1.53
20-23	28	4.66	1.44
23-25	20	4.56	1.31
25-30	48	4.22	1.19
30-40	29	3.78	1.11

DSL®. Unidades en µg/ml

Tabla 20. IGF-1 libre. Valores de normalidad.

Estadio (Tañer)	Varones		Mujeres	
	N	Media \pm SD	N	Media \pm SD
T I	20	0.32 \pm 0.13	20	0.35 \pm 0.16
T II	20	0.37 \pm 0.22	20	0.74 \pm 0.38
T III	19	1.56 \pm 0.85	10	1.79 \pm 0.81
T IV	20	2.03 \pm 1.21	20	1.84 \pm 0.93
T V	11	0.61 \pm 0.27	20	0.87 \pm 0.42

Argente J. Unidades en ng/ml

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANALÍTICAS Y GENÉTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA ANTES DEL INICIO DEL TES

1.1 Características demográficas

1.1.1 Distribución geográfica

Un total de 50 casos han sido incluidos por tener al diagnóstico una edad inferior a 14 años. Esta cohorte representa el 25.5% de los pacientes incluidos en el REEG a fecha de octubre de 2001. Las comunidades autónomas con porcentaje mayor de casos con diagnóstico antes de los 14 años de edad son las de Andalucía y Comunidad Valenciana con un 24 y 18% respectivamente. Otras comunidades con un porcentaje significativo de casos registrados son Cataluña y Extremadura con un 12% y Aragón con un 10%. En la Figura 7 se presenta la distribución geográfica.



Figura 7. Distribución geográfica de la población de Gaucher infantil (<14 años).

1.1.2 Distribución por grupos de edad y sexo

Como criterio de inclusión en la muestra se estableció el diagnóstico previo a los 14 años. De los pacientes seleccionados un 50% presentaban una edad inferior a 5 años. Un 10% fueron diagnosticados antes del año de edad; correspondiendo 2 casos a EG tipo 2 y 1 caso a EG tipo 3. Los otros dos casos cumplían criterios clínicos de EG tipo 1 al no presentar afectación neurológica, si bien sus genotipos eran L444P/L444P y

D409H/D409H. En la Figura 8 se presenta la distribución por grupos de edad (intervalos utilizados en el índice de gravedad de Zimran).

En relación a la distribución por sexos la muestra recoge un 54% de varones (n=27) frente a un 46% de mujeres (n=23).

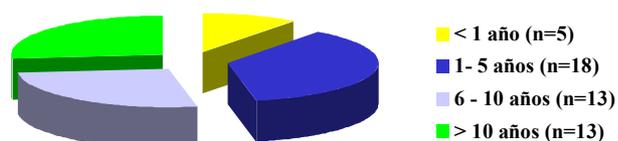


Figura 8. Distribución por grupos de edad.

1.2 Características clínicas

1.2.1 Distribución por tipos de EG

El 88% de casos registrados y seleccionados correspondían a pacientes afectados de EG tipo 1 (n=44). Los seis pacientes afectados de formas neuronopáticas correspondían de acuerdo a la distribución clásica de la enfermedad a EG tipo 2 (n=2) y EG tipo 3 (n=4). En la Figura 9 se recoge la distribución por tipos de la enfermedad.

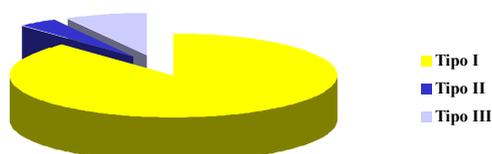


Figura 9. Distribución por tipos de la EG.

1.2.2 Manifestaciones clínicas

1) Visceromegalias

La presencia de visceromegalias fue una constante en esta cohorte. La esplenomegalia estaba presente al diagnóstico en el 95.2% de los casos en los que había sido documentado el tamaño esplénico (40/42). El tamaño esplénico medio bajo el reborde costal determinado mediante ecografía era 11.6 ± 8.3 cm. con un rango de 0 a 35 cm.

Un 16% de los pacientes estudiados habían sido esplenectomizados (8/50), correspondiendo a casos de diagnóstico más antiguo antes de iniciarse el TES. En la

- RESULTADOS -

Tabla 21 se presentan las diferencias encontradas para las distintas variables clínico y analíticas entre pacientes esplenectomizados y no esplenectomizados.

La hepatomegalia estuvo presente en el 89.5% de los pacientes en los que había sido documentado el tamaño hepático (43/48). El tamaño hepático medio bajo el reborde costal determinado mediante ecografía era de 6.3 ± 6.4 cm. con un rango de 0 a 30 cm.

Tabla 21. Características de los pacientes esplenectomizados

Variable	Esplenectomía (n=8)	No esplenectomía (n=34)	p
Edad diagnóstico (años)	8.4 ± 5.6	6.6 ± 4.2	0.421
Tamaño hepático (cm)	11.2 ± 9.5	5.3 ± 5.3	0.128
Afectación ósea	75%	30.9%	0.034
Hemoglobina (g/dL)	10.2 ± 1.6	11.4 ± 1.7	0.110
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	196.6 ± 130.7	106.1 ± 51.2	0.092
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	7.3 ± 4.8	6.3 ± 3.1	0.603
ALT (U/L)	44 ± 21.7	24.5 ± 14.2	0.041
AST (U/L)	58 ± 22.3	44.2 ± 19.2	0.142
GGT (U/L)	79 ± 85.6	33 ± 52.3	0.187
Colesterol total (mg/dL)	146 ± 32.5	126 ± 44.1	0.194
HDL colesterol (mg/dL)	27 ± 6.9	26 ± 7.7	0.604
LDL colesterol (mg/dL)	93 ± 26.9	77 ± 39.3	0.347
Índice aterogénico	5.9 ± 1.7	4.8 ± 1.2	0.167
Triglicéridos (mg/dL)	112 ± 22.3	100 ± 41.2	0.293
Fosfatasa ácida (U/L)	34.8 ± 22.3	24.3 ± 13.3	0.271
Actividad QT (nM/mL.h)	32093 ± 13869	18311 ± 12264	0.050
β -glucosidasa (nM/mg.prot.h)	0.92 ± 0.53	0.77 ± 0.31	0.476
Mutación L444P	75%	35.7%	0.053
SSI	17.2 ± 7.7	9.1 ± 7.1	0.040
SSIA	20.5 ± 7.9	12.7 ± 7.1	0.060

2) Afectación ósea

Un 54% de los pacientes incluidos ha presentado diversos grados de afectación ósea. La mayor frecuencia de enfermedad ósea se relacionaba con el antecedente de esplenectomía ($p=0.034$). El 44% (22/50) de los pacientes presentaban la imagen en matraz de Erlenmeyer. Un 32% (16/50) a lo largo de su evolución han padecido crisis óseas. El 26% (13/50) de los pacientes ha presentado alteraciones mayores (infartos, fracturas, necrosis,...).

3) Otras manifestaciones clínicas

Como se ha señalado un 12% de los pacientes incluidos corresponden a formas neuronopáticas de la enfermedad, concretamente 2 pacientes con EG tipo 2 y 4 pacientes con EG tipo 3.

La presencia de pinguécula en la exploración ocular se constató en 7 pacientes (14%). Las alteraciones dermatológicas fueron documentadas en 2 pacientes (4%) y afectación pulmonar en un único paciente que presentó evidencia ecográfica de hipertensión pulmonar (2%).

4) Características del crecimiento lineal

En 16 pacientes antes de iniciarse el TES se analizó la correlación entre el Z-score de talla y las distintas variables clínicas, analíticas y genéticas estudiadas. En la Tabla 22 se presenta la correlación con el Z-score de cada variable analizada.

Tabla 22. Coeficientes de correlación para Z-score talla

Variable	Coefficiente de Spearman
Sexo	-0.21
Edad al diagnóstico	0.01
Tamaño hepático	-0.22
Tamaño esplénico	-0.51*
Esplenectomía	-0.41**
Afectación ósea	-0.06
Hemoglobina	-0.05

- RESULTADOS -

Variable	Coefficiente de Spearman
Recuento plaquetario	0.10
Recuento leucocitario	-0.02
AST	-0.16
ALT	0.05
GGT	-0.15
Fosfatasa ácida	-0.30
Triglicéridos	0.13
Colesterol total	-0.15
HDL colesterol	-0.15
IA	0.17
Actividad β -glucosidasa	-0.21
Actividad de quitotriosidasa	-0.44**
Mutación L444P	-0.43**
SSI	-0.01
SSIA	-0.04

* p <0.05 (Dos colas de distribución)

** p <0.05 (Una cola de distribución)

Un 57% de los pacientes estudiados presentaban una talla por debajo del percentil 10, mientras que un 42% su talla se situaba por debajo del percentil 3 en relación a los estándares del Centro Andrea Prader del Gobierno de Aragón.

1.3 Características analíticas

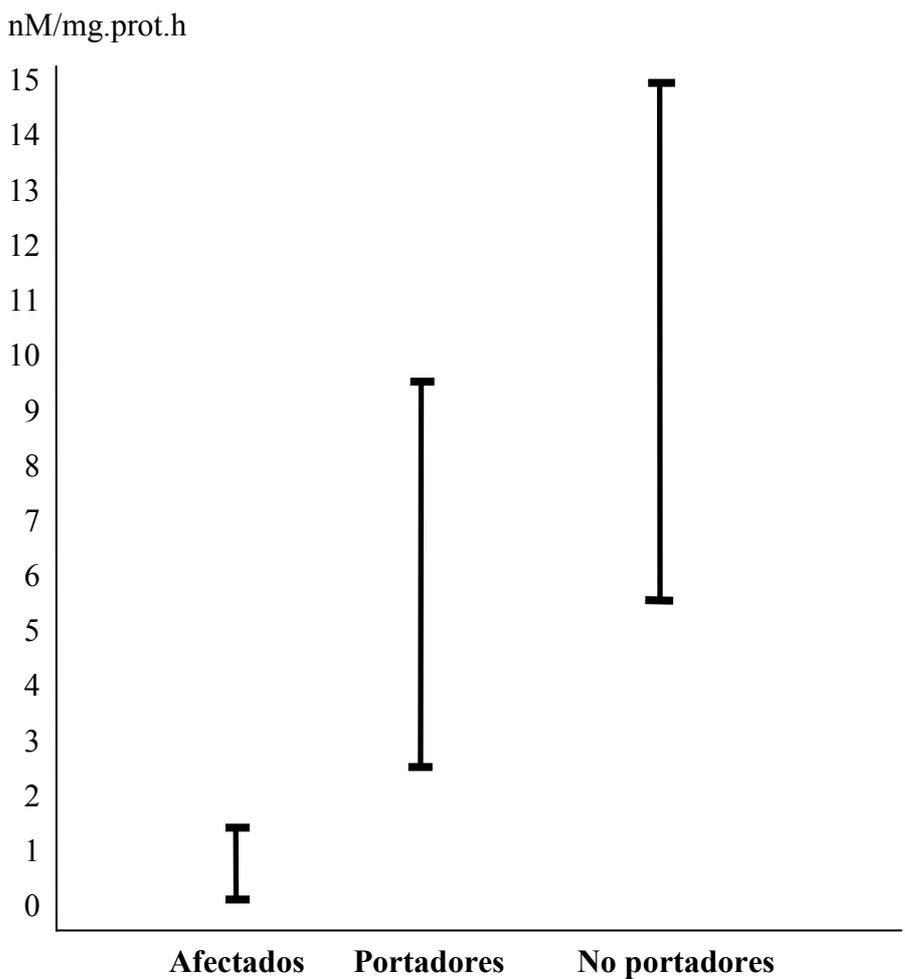
1) Actividad de β -glucosidasa ácida

Una actividad de β -glucosidasa ácida menor de un 10% de los valores de normalidad es diagnóstico de EG. Los pacientes incluidos en el estudio presentaban una actividad de 0.80 ± 0.36 (0.05 – 1.6) nM/mg.prot.h.

- RESULTADOS -

Por el contrario en la cohorte de familiares sanos estudiados si bien se confirmaron las diferencias significativas entre individuos portadores y no portadores (6.05 ± 1.81 vs 10.18 ± 2.43 nM/mg.prot.h; $p=0.000$), se constató la existencia de niveles de actividad de β -glucosidasa ácida superponible entre los dos grupos. El 11.47% de los individuos portadores presentaban una actividad de β -glucosidasa ácida situada en -1 desviación estándar de los individuos no portadores. Entre estos últimos, un 27.77% presentaban una actividad de β -glucosidasa ácida en $+1$ desviación estándar de los individuos portadores.

La distribución de la actividad enzimática en pacientes, portadores y no portadores se refleja en la Figura 10.



(Rango entre -2 D.S. y $+2$ D.S.)

Figura 10. Actividad de β -glucosidasa ácida

- RESULTADOS -

2) Alteraciones hematológicas

La presencia de citopenias, moderadas en la mayoría de los casos, es otra de las características del grupo estudiado. Un 72.3% de los pacientes presentan algún tipo de citopenia. Los niveles de hemoglobina se sitúan en 11.2 ± 1.7 g/dL, con un 45.6% (21/46) de los individuos incluidos con niveles inferiores a 11 g/dL. El recuento plaquetario era de $121.5 \pm 77.1 \times 10^9/L$, con un 46.8% (22/47) de los individuos incluidos con recuentos inferiores a $100 \times 10^9/L$. Por último el recuento leucocitario era de $6.5 \pm 3.4 \times 10^9/L$, con un 31.9% (15/47) de los individuos incluidos con recuentos inferiores a $5 \times 10^9/L$. En la Tabla 22 se recogen los datos hematológicos de la muestra.

3) Alteraciones de las enzimas hepáticas

La AST es la enzima hepática más frecuentemente alterada en esta población; hasta un 50% (23/46) de los pacientes presentaban niveles mayores de 40 U/L al diagnóstico. La ALT se encontraba elevada en el 17.4% (8/46). La GGT se situaba por encima de 50 U/L en el 21% de los individuos estudiados (8/38).

Por último la Fosfatasa ácida estaba invariablemente elevada en todos los pacientes estudiados, con un nivel medio de 26.2 ± 15.5 U/L. En la Tabla 23 se incluyen los datos referentes a la función hepática.

Tabla 23. Parámetros hematológicos y bioquímicos

Parámetro	Media \pm D.S.	Rango	n
Hemoglobina (g/dL)	11.2 ± 1.7	6.8 – 14.7	46
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	121.5 ± 77.1	7 - 358	47
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	6.5 ± 3.4	1.9 – 18.1	47
ALT (U/L)	28 ± 17.2	6 – 82	46
AST (U/L)	47 ± 20.2	18 – 89	46
GGT (U/L)	43 ± 62.3	7 - 297	38
Fosfatasa ácida (U/L)	26 ± 15.5	5.7 - 80	39

4) Perfil lipídico

En 46 pacientes se realizó determinación de colesterol total antes del inicio del tratamiento. Un 45.6% de este grupo presentaba niveles de colesterol inferiores a 120 mg/dl. En 38 pacientes se determinó igualmente antes de iniciarse el tratamiento HDL colesterol. Un 84.2% de estos pacientes presentó niveles inferiores a 35 mg/dl. En la Tabla 24 se presentan las características del perfil lipídico de los pacientes a estudio.

Tabla 24. Perfil lipídico en individuos afectados de EG

Parámetro	Media \pm D.S.	Rango	n
Colesterol total (mg/dL)	129 \pm 42.8	58 – 282	46
HDL colesterol (mg/dL)	26 \pm 7.5	15 - 44	35
IA (Colesterol total / HDL)	5 \pm 1.3	2.5 – 7.5	35
Triglicéridos (mg/dL)	94 \pm 34	34 – 151	37

En una muestra de 42 familiares no afectados de EG (21 portadores y 21 no portadores) se estudió el perfil lipídico analizando los mismos parámetros que en los individuos afectados. En la Tabla 25 se exponen los parámetros analizados en población sana.

Tabla 25. Perfil lipídico en familiares sanos

Parámetro	Portadores	No portadores	p
Colesterol total (mg/dL)	177 \pm 36.1	178.3 \pm 30.3	0.668
HDL colesterol (mg/dL)	41 \pm 5.2	51.9 \pm 11.4	0.001
IA (Colesterol total / HDL)	4.3 \pm 0.9	3.5 \pm 1,0	0.020
Triglicéridos (mg/dL)	81 \pm 31.9	77 \pm 49.3	0.403

Como se aprecia en la Tabla 24 el estado de portador de una mutación del GBA se asociaba a niveles disminuidos de HDL colesterol y un incremento del IA en relación a los individuos no portadores de forma significativa.

- RESULTADOS -

Cuando se estableció la comparación de estos dos grupos de individuos sanos con el grupo de individuos afectados de EG se encontró niveles disminuidos de colesterol total ($p < 0.001$) tanto en relación con los individuos portadores como no portadores; niveles igualmente disminuidos de la fracción HDL en relación a los dos grupos de individuos sanos ($p < 0.001$) e incremento del IA ($p = 0.044$ y $p < 0.001$, respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticas significativas en los niveles de triglicéridos ($p = 0.129$ y $p = 0.061$, respectivamente).

5) Actividad de QT

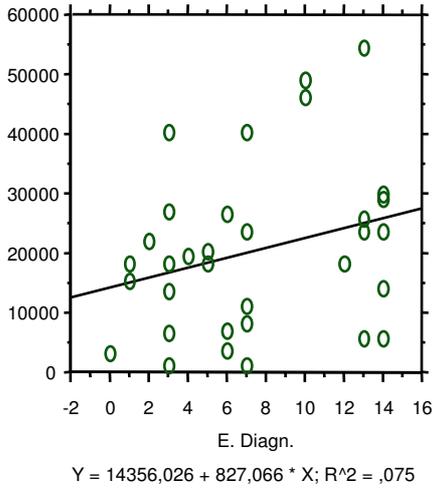
La actividad de quitotriosidasa determinada en 33 pacientes de la muestra antes de iniciarse el TES era de 20446.2 ± 13989.5 nM/mL.h. En la Tabla 26 se presenta el estudio de correlación de la actividad de quitotriosidasa con las distintas variables clínicas y analíticas estudiadas; estableciéndose tres grupos: el grupo total (Grupo 1), el grupo portador del defecto en el gen de la quitotriosidasa (Grupo 2) y el grupo de pacientes sin defecto en el gen de la quitotriosidasa (Grupo 3). En las Figuras 11 se presentan las rectas de regresión lineal de las variables analizadas.

Tabla 26. Estudio de correlación de la actividad de quitotriosidasa

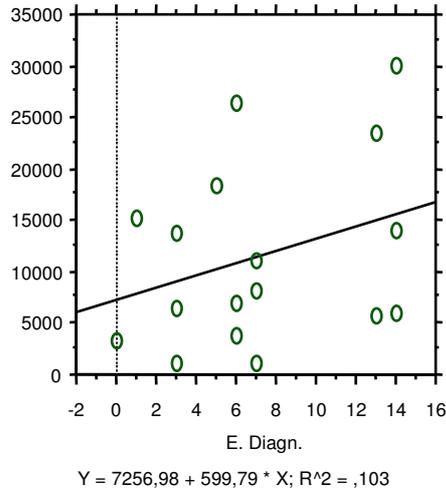
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Edad diagn.	0,27	0,24	0,37
SSI	0,66($p < 0,001$)	0,51	0,65($p = 0,012$)
SSIA	0,63($p < 0,001$)	0,43	0,65($p = 0,011$)
Hígado	0,06	0,41	0,29
Bazo	0,63($p < 0,001$)	0,69($p = 0,005$)	0,71($p = 0,005$)
Esplenectomía	0,41($p = 0,016$)	0,22	0,55($p = 0,042$)
Af. Ósea	0,41($p = 0,021$)	0,25	0,20
Hb	-0,09	-0,53($p = 0,041$)	0,25
Plaquetas	0,30	0,1	0,34
Leucocitos	0,14	0,1	0,21
AST	0,23	-0,12	0,07
ALT	0,20	0,20	0,17
F.A.	0,35	0,43	0,08
Triglicéridos	0,44($p = 0,015$)	0,66($p = 0,008$)	0,16
Colesterol	0,04	0,26	0,41
HDL	-0,41($p = 0,031$)	-0,49	0,19
IA	0,47($p = 0,012$)	0,68($p = 0,005$)	0,21
B-glucosidasa	0,22	-0,08	0,40
L-444-P	-0,01	-0,37	0,20

- RESULTADOS -

Grupo I



Grupo II



Grupo III

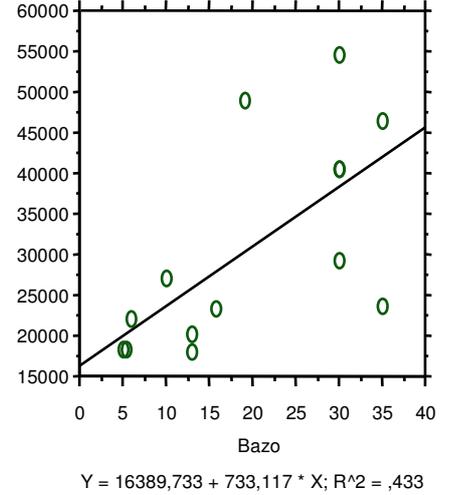
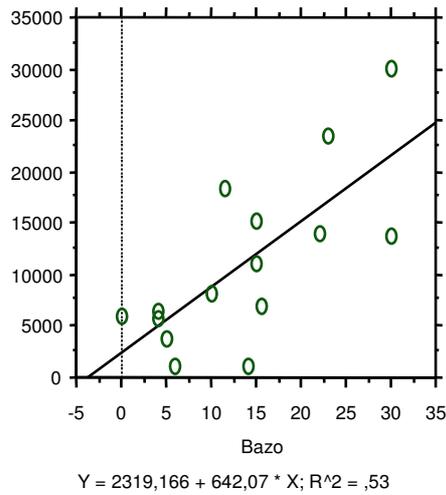
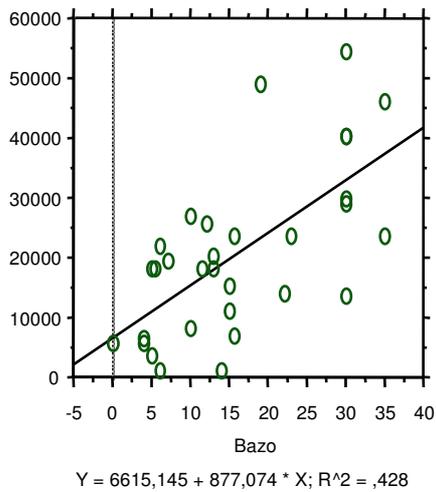
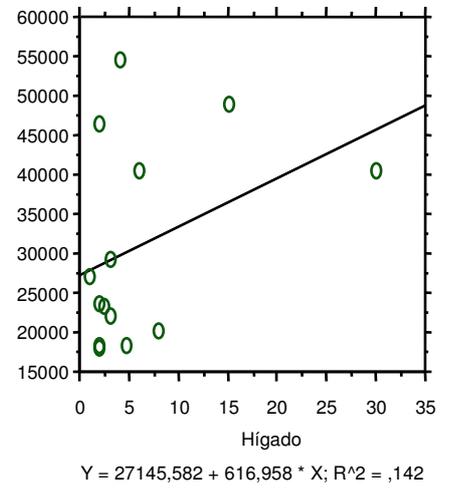
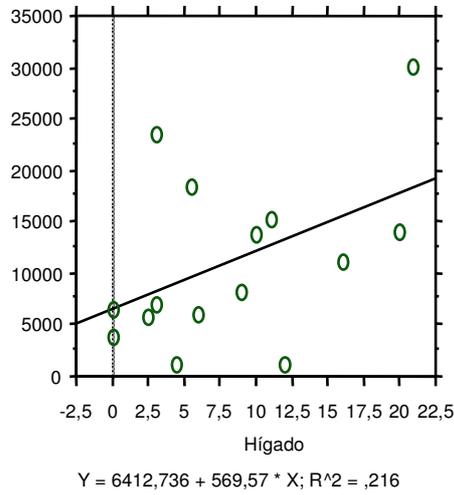
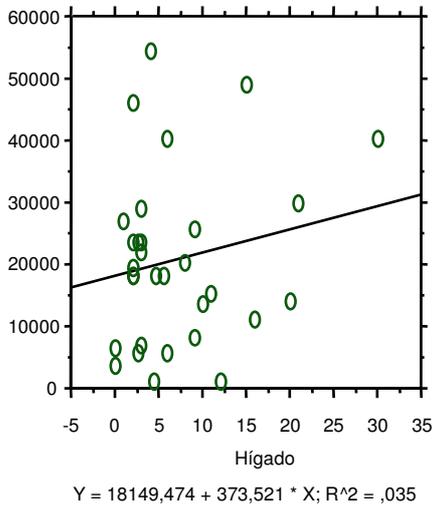
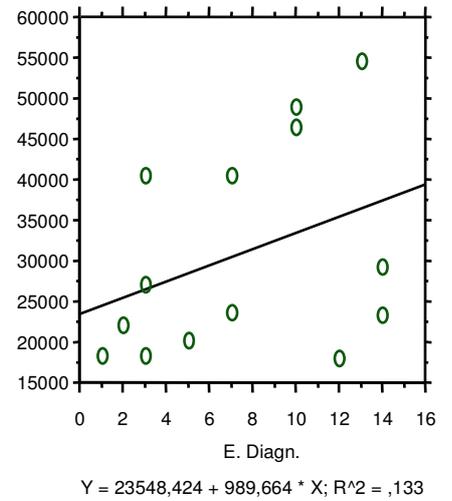


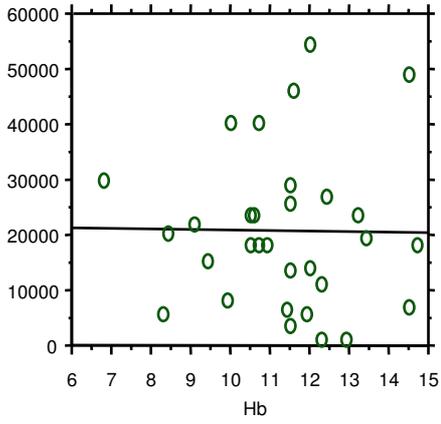
Figura 11. Rectas de regresión lineal (QT – variables clínicas y analíticas).

- RESULTADOS -

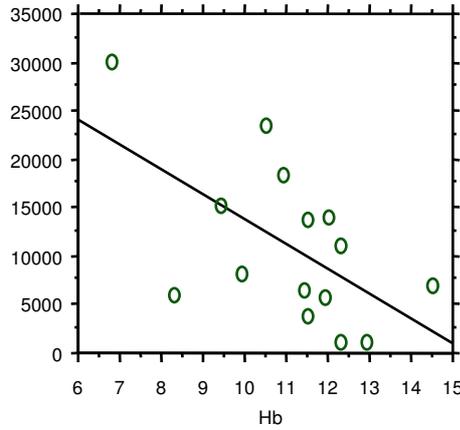
Grupo I

Grupo II

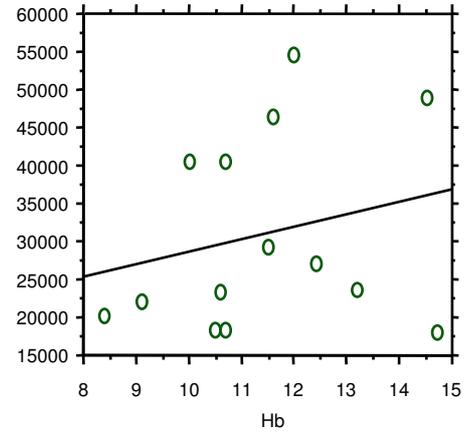
Grupo III



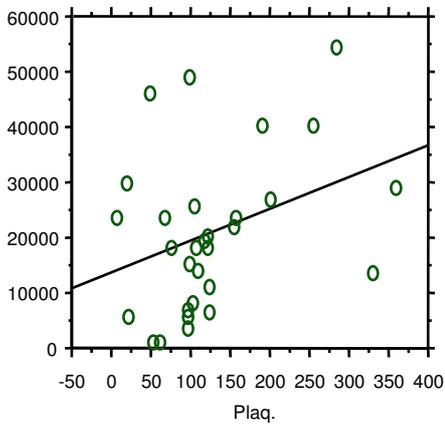
$Y = 21739,631 - 83,413 * X; R^2 = 1,171E-4$



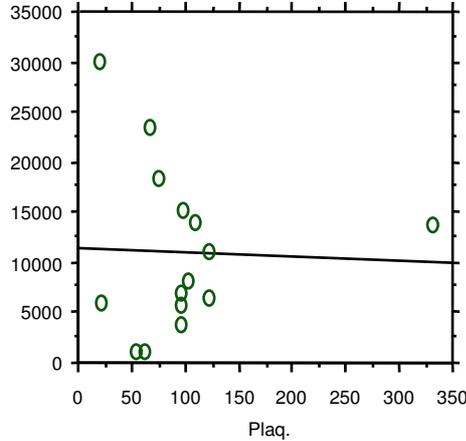
$Y = 39366,644 - 2552,822 * X; R^2 = ,346$



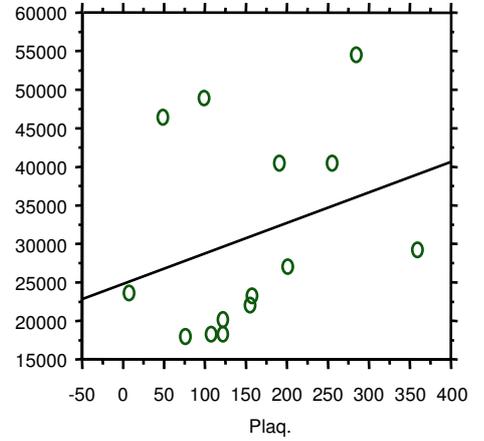
$Y = 12147,341 + 1641,903 * X; R^2 = ,056$



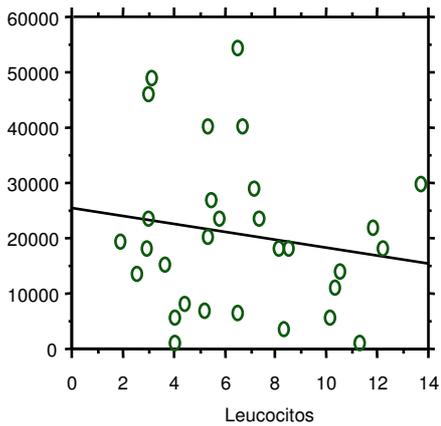
$Y = 13589,665 + 57,99 * X; R^2 = ,122$



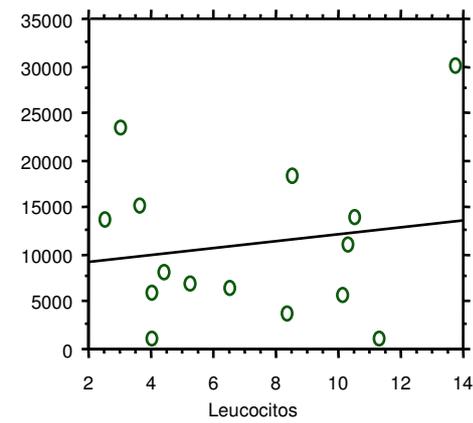
$Y = 11503,87 - 4,157 * X; R^2 = ,001$



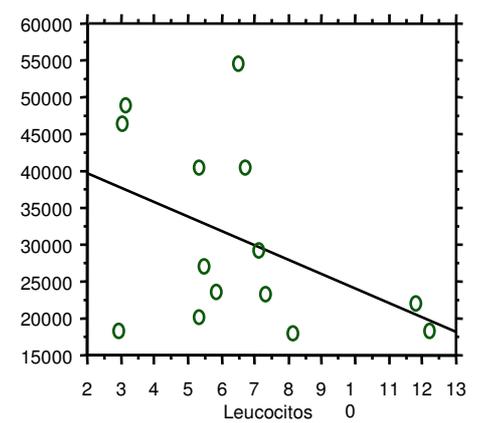
$Y = 24823,265 + 39,224 * X; R^2 = ,086$



$Y = 25380,928 - 719,105 * X; R^2 = ,027$



$Y = 8545,865 + 361,481 * X; R^2 = ,024$



$Y = 43408,209 - 1933,87 * X; R^2 = ,187$

Figura 11. Rectas de regresión lineal (QT – variables clínicas y analíticas).

- RESULTADOS -

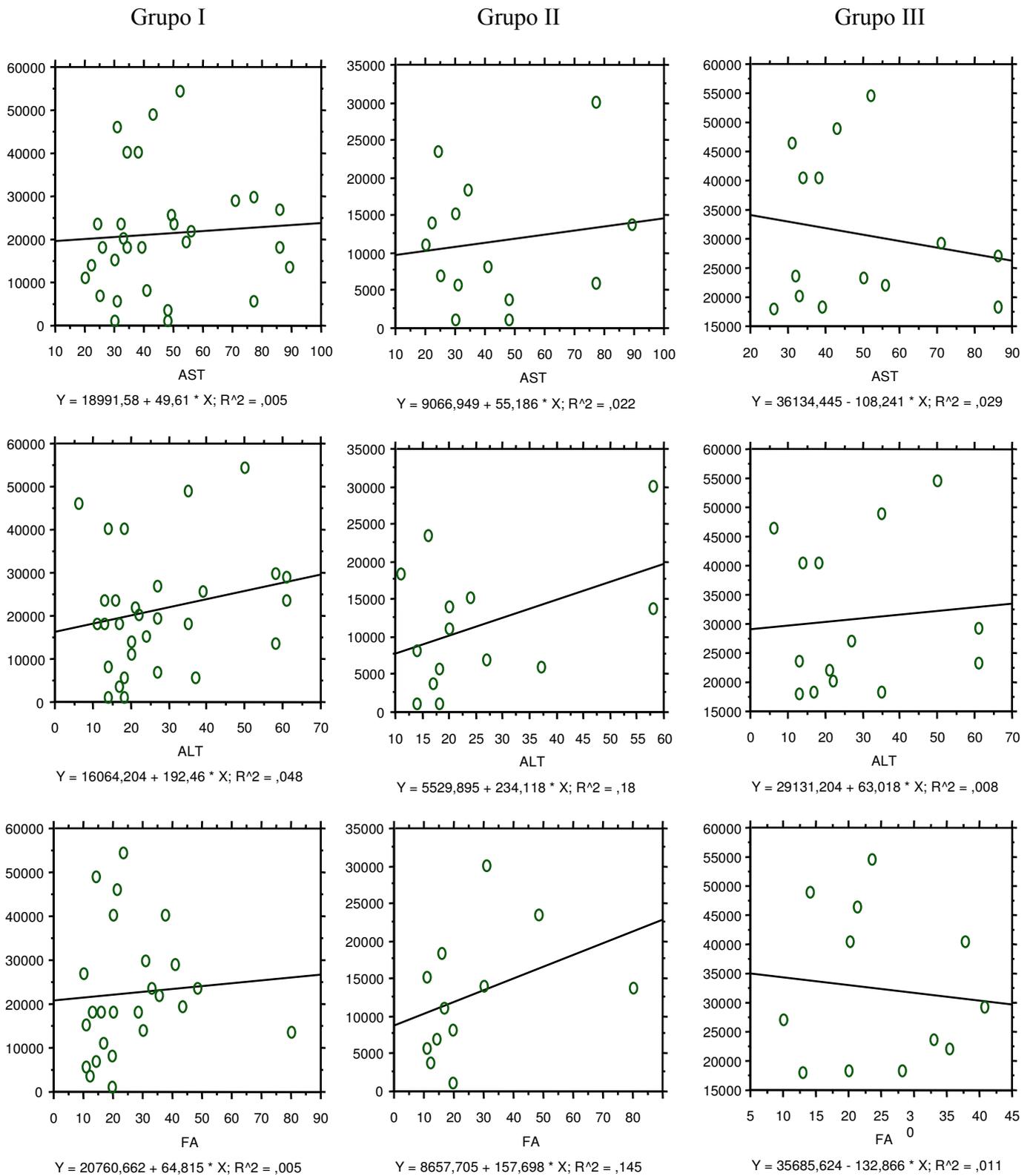
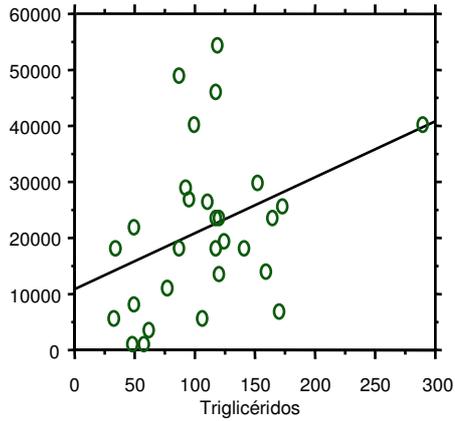


Figura 11. Rectas de regresión lineal (QT – variables clínicas y analíticas).

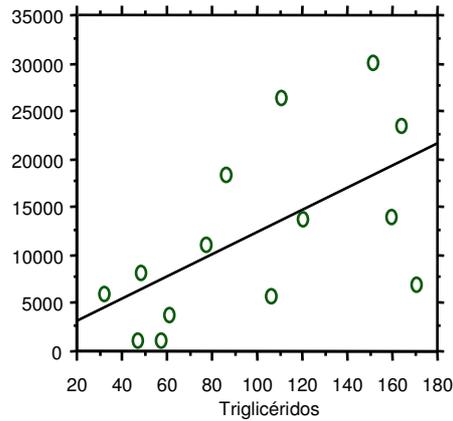
- RESULTADOS -

Grupo I



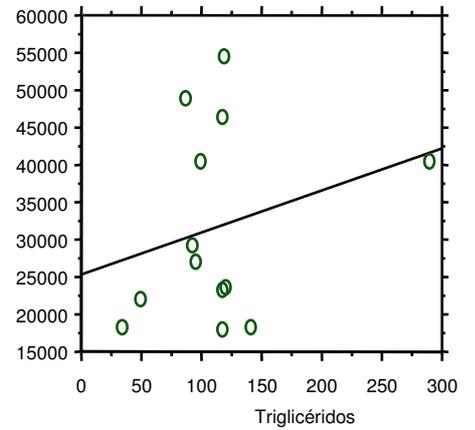
$Y = 10773,631 + 100,374 * X; R^2 = ,14$

Grupo II

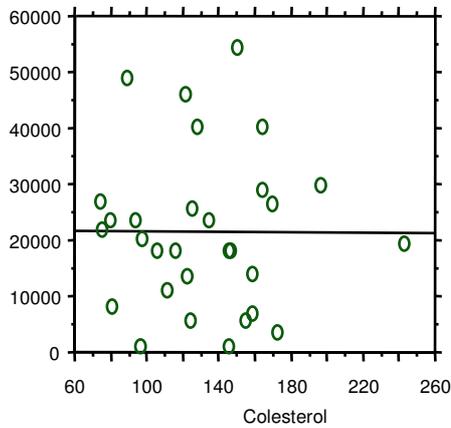


$Y = 731,372 + 115,839 * X; R^2 = ,352$

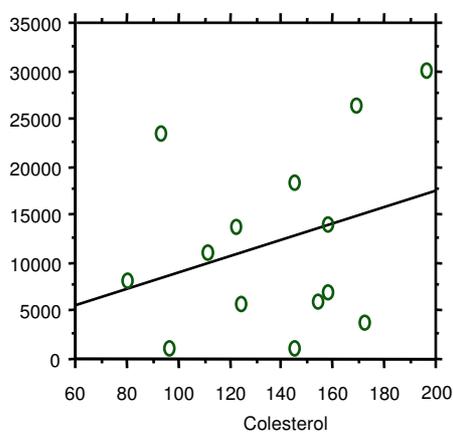
Grupo III



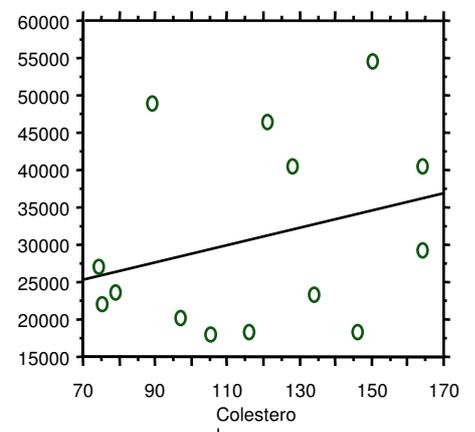
$Y = 25391,225 + 55,974 * X; R^2 = ,069$



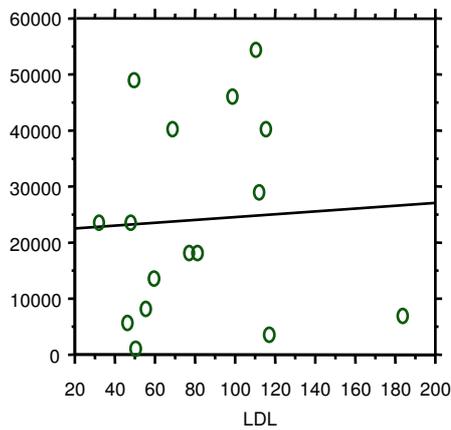
$Y = 21837,633 - 1,509 * X; R^2 = 1,74E-5$



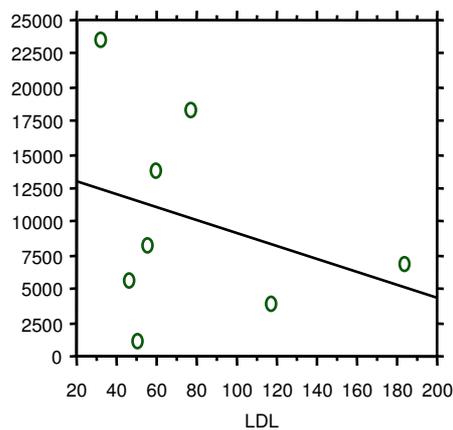
$Y = 610,156 + 84,488 * X; R^2 = ,094$



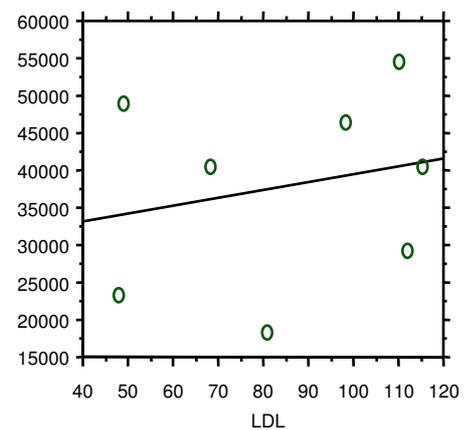
$Y = 17286,143 + 116,076 * X; R^2 = ,084$



$Y = 22079,045 + 24,383 * X; R^2 = ,003$



$Y = 14037,583 - 48,747 * X; R^2 = ,1$



$Y = 29156,622 + 102,192 * X; R^2 = ,049$

Figura 11. Rectas de regresión lineal (QT – variables clínicas y analíticas).

- RESULTADOS -

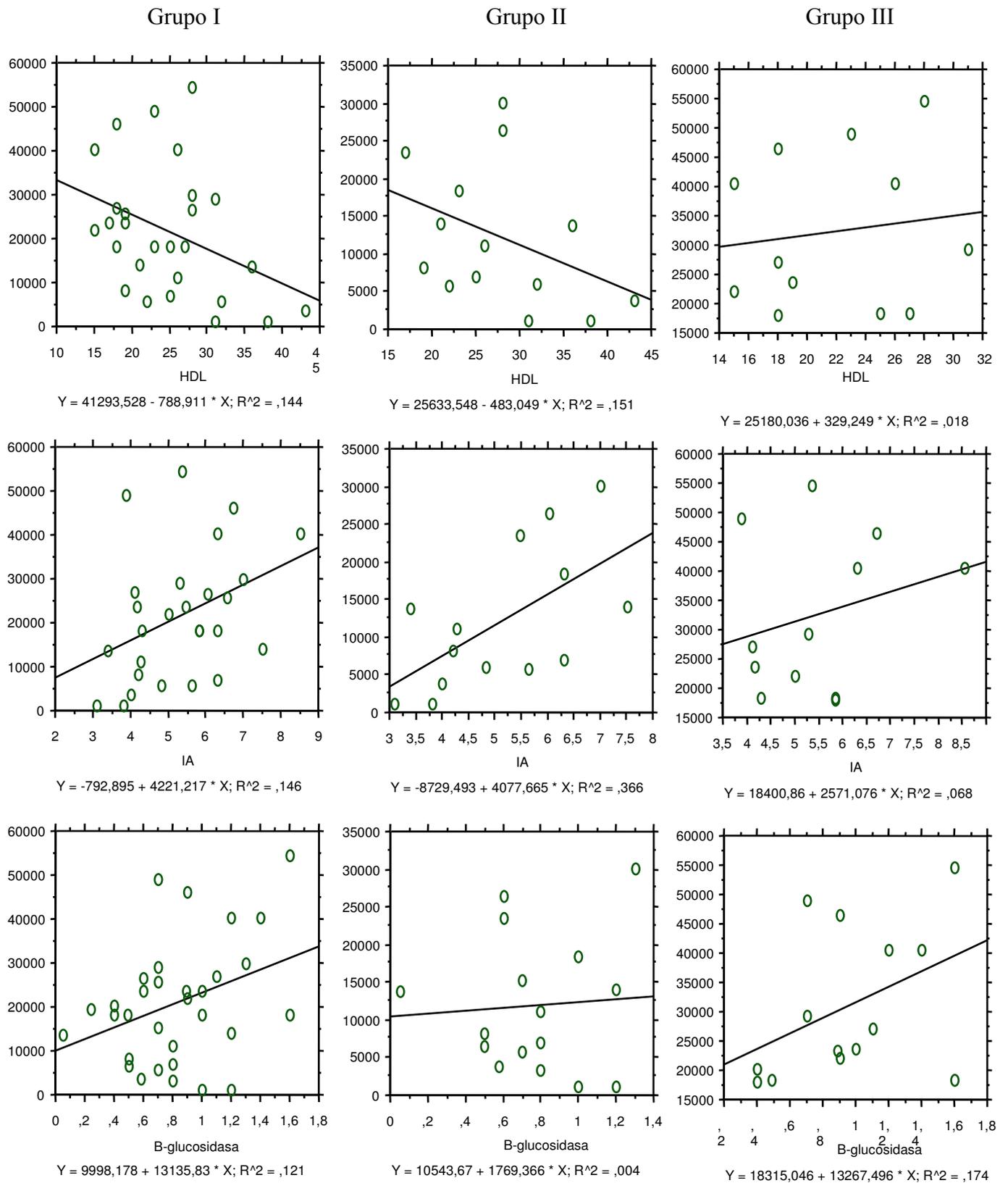


Figura 11. Rectas de regresión lineal (QT – variables clínicas y analíticas).

- RESULTADOS -

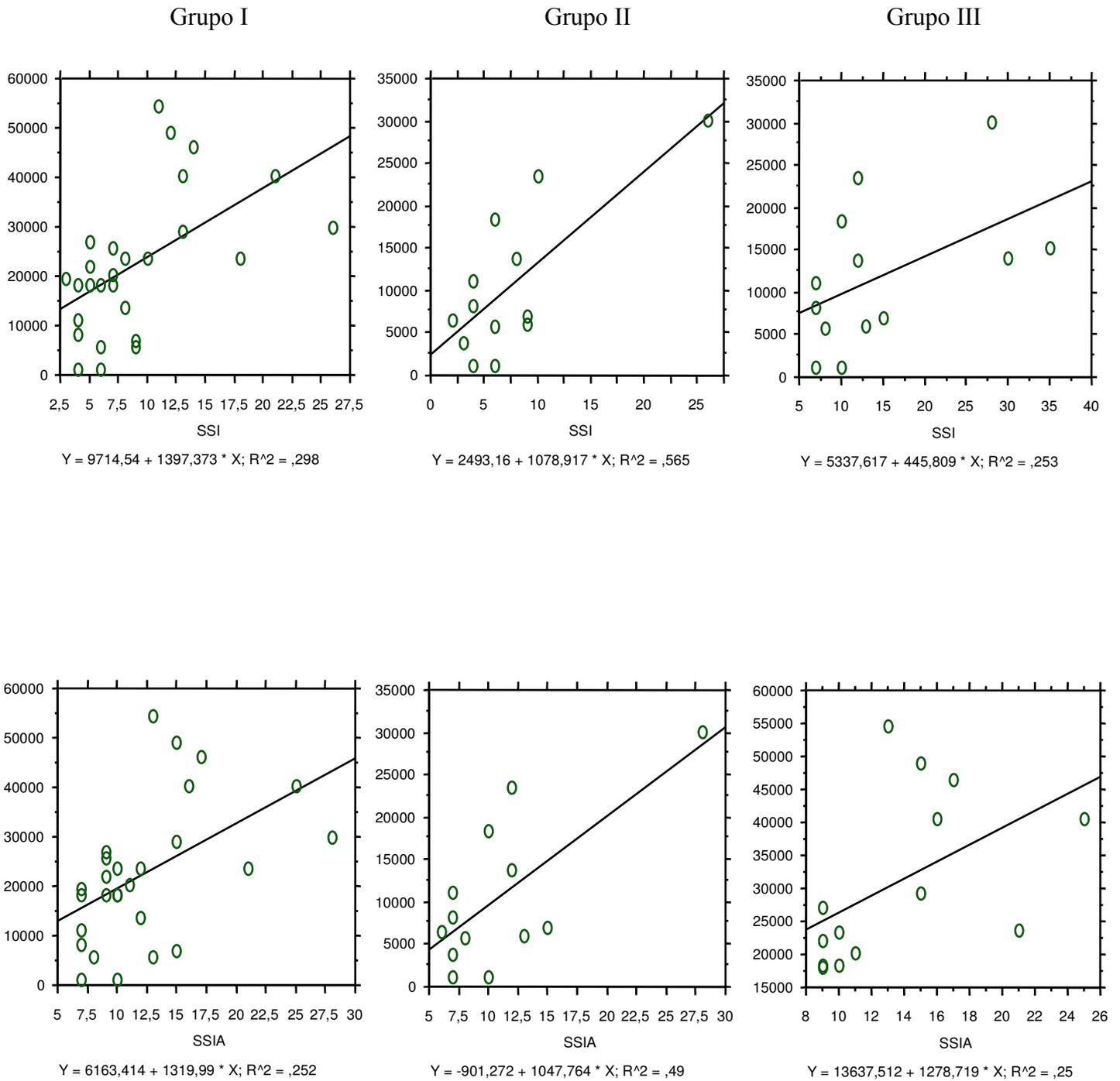


Figura 11. Rectas de regresión lineal (QT – variables clínicas y analíticas).

- RESULTADOS -

En 31 individuos se realizó análisis genético del gen de la QT, encontrándose la duplicación responsable del déficit de quitotriosidasa en heterocigosidad en 17 individuos. Ninguno de los pacientes estudiados tenía un déficit completo de QT (presencia de la duplicación en homocigosidad). Se comprobó que aquellos portadores en heterocigosidad de dicho defecto tenían una actividad reducida en relación a los individuos con ambos genes intactos (11561.3 ± 8829.2 vs 30830.1 ± 12826.3 nM/mL.h; $p < 0.001$).

6) Factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) y sus proteínas transportadoras
En 22 pacientes de la cohorte se estudiaron IGF-1 total, IGF-1 libre, IGFBP-3 y ALS total. La edad media al diagnóstico de la muestra seleccionada era de 7.25 años (Rango:0.3 - 14 años), siendo la distribución por sexos varones / mujeres de 12/10.

Los datos clínicos y analíticos de este subgrupo se presentan en las Tablas 27 y 28. La esplenomegalia estaba presente en todos los pacientes al diagnóstico. Un 18.1% de los pacientes había sido esplenectomizado. El 50% de la muestra presentaba niveles de hemoglobina menores de 11 g/dL, un 45,4% recuentos plaquetarios inferiores a $100 \times 10^9/L$ y un 18,1% un recuento leucocitario menor de $4.0 \times 10^9/l$. Los niveles elevados de fosfatasa ácida se constataron en la totalidad de casos incluidos y en un 63.6% se encontraron leves alteraciones en la función hepática que se corrigieron en todos los casos con el TES. La actividad de β -glucosidasa ácida se situaba en el rango de enfermedad en todos los pacientes.

Como en la cohorte total, en este subgrupo las mutaciones predominantes eran la N370S y la L444P con una frecuencia alélica de 43.18% y 20.45%, respectivamente (Tabla 29).

Tabla 27. Variables clínicas.

Variable	<i>n</i>	%
Hepatomegalia	21	95,4%
Esplenomegalia	22	100%
Esplenectomía	4	18,1%
Enfermedad ósea	14	63,6%

Tabla 28. Variables analíticas.

Variable	<i>media ±SD*</i>	<i>Rango</i>
Hemoglobina (g/dL)	11.5 ± 1.6	9.1-14.5
Recuento leucocitario (x10 ⁹ /L)	6.7 ± 3.2	1.9-13.7
Recuento plaquetario (x10 ⁹ /L)	129 ± 83	7- 358
AST (U/L)	43 ± 20	18-89
ALT (U/L)	27 ± 18	11-82
Fosfatasa ácida (U/L)	26 ± 13.6	6-59
β-glucosidasa ácida**	0.81 ± 0.39	0.1-1.6

* SD: desviación estándar

** nM/mg.prot.h

Tabla 29. Frecuencia alélica.

Alelo	<i>n</i>	<i>%</i>
N370S	19	43.2%
L444P	9	20.4%
Otras	8	18.2%
Desconocidas	8	18.2%

Se determinó IGF-I total, IGF-I libre, IGFBP-3 antes del tratamiento en 19 pacientes.

Se encontró una asociación significativa entre IGF-1 total y el SSIA en este grupo antes de iniciarse el TES ($r=-0.62$, $p<0.05$).

- RESULTADOS -

IGF-1 total y IGFBP-3 presentaban una correlación negativa con la presencia de la mutación L444P ($r=-0.53$ and -0.5 ; respectivamente, $p<0.05$).

El Z-score de talla se correlacionaba de forma significativa con los niveles de IGF-1 total y IGFBP-3 in 8 pacientes en crecimiento ($r=0.84$ and 0.78 ; respectivamente, $p<0.05$). En la Tabla 30 se presentan las correlaciones significativas encontradas entre los IGFs y las demás variables clínicas y analíticas de la enfermedad.

Tabla 30. Correlaciones del eje IGF antes del TES

Factor de crecimiento	Variable	r de Spearman*
IGF-1 total	SSIA	-0.62
	SSI	-0.52
	L444P	-0.53
	Z-score talla	0.84
IGF-1 libre	AST	-0.53
IGFBP-3	L444P	-0.50
	Z-score talla	0.78

* $p < 0.05$

En la Figura 12 se presentan las rectas de regresión lineal para IGF-I total e IGFBP-3 con la talla y de IGF-I con el SSIA.

- RESULTADOS -

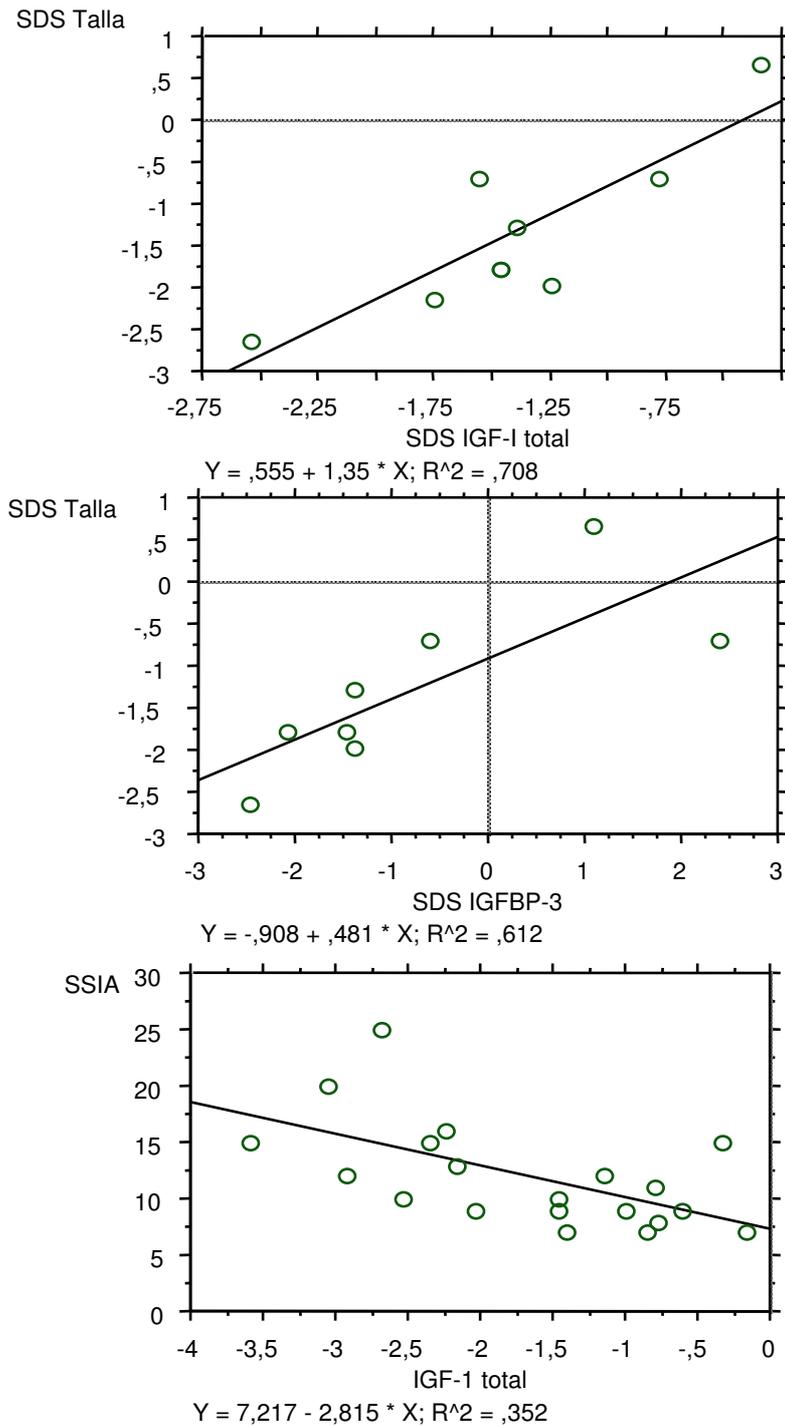


Figura 12. Regresión lineal IGF-I e IGFBP-3 con la talla e IGF-I con SSIA

7) Genes relacionados con el crecimiento y diferenciación celular y con expresión alterada

En los dos pacientes adultos en los que se realizó biopsia hepática se encontraron los siguientes genes relacionados con el crecimiento y diferenciación celular con una expresión disminuida en relación a los controles (valores expresados en función de la relación paciente con EG / controles).

- RESULTADOS -

	Grado de expresión	
	Paciente 1	Paciente 2
1- Gen del IGF-2	-6.7	-2.3
2- Gen del IGFBP-2	-1.9	-3
3- Gen del IGFBP-4	-2.5	-1.9
4- Gen del ORP-150 (chaperona inducible por oxígeno)	-2.3	-3.5
5- Gen del Citocromo P(1)450	-8.7	-1.8
6- Gen de la Glicina-N-metiltransferasa	-3.4	-1.7
7- Gen del GP-39 del cartílago humano	-4.4	-11.5
8- Gen la PZP (proteína zona del embarazo)	-5	-3.3
9- Gen de la proteína leucine-zipper (BZAP45)	-5.7	-1.9
10- Gen GRO	-5.2	-1.6

1.4 Score pronóstico en la población a estudio

Con las distintas variables clínicas y analíticas se estableció el SSI, así como el SSIA. El SSI medio en 40 pacientes afectados de EG tipo I en los que se pudo establecer fue de 8.6 ± 5.1 ; mientras que el SSIA era de 12 ± 4.9 ; lo que situaba a esta población en su conjunto dentro de un grado leve - moderado de EG. En relación al SSIA un 50% (n=20) de los pacientes con EG tipo I presentaban un score ≤ 10 (grado leve). Un 45% (n=18) presentaban un score entre 11-25 (grado moderado). Finalmente un 5% (n=2) de los pacientes con EG tipo I quedaban clasificados dentro del grado grave al presentar un score ≥ 26 . El antecedente de esplenectomía y la afectación ósea (sobre todo formas graves) condicionaban los score más elevados como se puede comprobar en la Tabla 31.

Tabla 31. Grados de gravedad según SSIA

SSIA	Esplenectomía (%)	Afectación ósea (%)	Afectación ósea grave (%)*
Leve: 50%	0%	45%	0%
Moderado: 45%	22.2%	72.2%	38.8%
Grave: 5%	100%	100%	100%

* Afectación ósea grave: Necrosis, infartos, fracturas patológicas.

- RESULTADOS -

En cuatro pacientes con EG neuronopática (1 tipo 2 y 3 tipo 3) el SSI era de 29 ± 4.5 y el SSIA de 33.5 ± 4.3 ; correspondiendo por consiguiente según el score de gravedad de Zimran a formas graves de la enfermedad ya que la existencia de afectación neurológica recibe una puntuación de 20.

1.5 Genotipo

Se ha realizado estudio genético en los 50 pacientes de la muestra. En 33 casos se han identificado las dos mutaciones, en 15 una de las dos y por último en dos pacientes no se ha identificado ninguna mutación.

En la Tabla 32 se presentan los distintos genotipos encontrados en esta población y en la Tabla 33 la frecuencia alélica.

Tabla 32. Genotipos en EG de diagnóstico en edad pediátrica

Genotipo	%	n
N370S/N370S	2%	1
N370S/L444P	32%	16
N370S/otras*	18%	9
N370S/desconocida	28%	14
L444P/L444P	6%	3
L444P/E326K	2%	1
L444P/desconocida	2%	1
Otras/otras**	6%	3
Desconocida/desconocida	4%	2

* G195W, T134P, G377S, Y313H, G202R, recombinaciones (n=2), deleciones (n=2).

** G377S/G195W, R463/G377S, D409H/D409H.

En los casos clasificados desde un punto de vista clínico como formas neuronopáticas (n=6) se encontraron los siguientes genotipos: Tipo 2 (n=2): L444P/L444P y

L444P/desconocida. Tipo 3 (n=4): G377S/G195W, N370S/G195W, L444P/E326K y desconocida/desconocida.

Tabla 33. Frecuencia alélica

Mutación	%	n
N370S	41%	41
L444P	24%	24
G377S	3%	3
D409H	2%	2
G195W	2%	2
Recombinaciones	2%	2
Delecciones	2%	2
Otras	5%	5
Desconocida	19%	19

Dado que la mutación L444P se asocia con un peor pronóstico se analizó la asociación entre dicha mutación y las distintas variables clínicas y analíticas de la enfermedad antes analizadas, no encontrándose ninguna asociación significativa a excepción de la correlación negativa existente entre la presencia de esta mutación y los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina, IGF-1 total y su proteína transportadora IGFBP-3; así como la correlación también negativa aunque moderada ($r=-0.43$; significativa para una cola de distribución, $p=0.043$) con la talla de los niños afectos en edad de crecimiento antes de iniciarse el TES; todo lo cual será analizado en el apartado de crecimiento. Así mismo se ha de señalar la mayor frecuencia de dicha mutación entre los individuos esplenectomizados (75% vs 35.7%; $p=0.053$) (Tabla 21).

Por otro lado se establecieron de acuerdo al genotipo 3 subgrupos: 1) N370S/L444P; 2) N370S / otras; 3) otras / otras. En la Tabla 34 se presentan las características diferenciales existentes entre estos 3 grupos.

Tabla 34. Características clínicas en relación al genotipo

Variable	N370S/L444P	N370S/ otras	otras / otras
Número de pacientes	17/49	22/49	10/49
Edad al diagnóstico+	8.3 ± 4.6	7.3 ± 3.6	3.7 ± 5
Visceromegalias (%)*	100	100	70
Esplenectomía (%)++	29.4	4.5	20
Citopenias (%)**	64.7	76.1	75
Afectación esquelética (%)	58.8	63.6	20
Función hepática alterada (%)***	68.8	38.1	75
SSIA+++	12.9 ± 6	12.4 ± 6.1	20.3 ± 12.2

* hepatomegalia y/o esplenomegalia; ** anemia y/o trombopenia.

*** AST y/o ALT y/o GGT alteradas (N370S/L444P vs N370S/otras: p=0.066)

+ N370S/L444 P vs otras / otras: p=0.032; ++ N370S/L444P vs N370S/otras: p=0.055;

+++ N370S/L444P vs otras / otras: p=0.141; N370/otras vs otras / otras: p=0.115.

2. RESPUESTA AL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SUSTITUTIVO

2.1 Número de casos en tratamiento

Un total de 39 pacientes de la muestra estudiada reciben en la actualidad TES. De los 11 casos sin tratamiento tres pacientes han fallecido, correspondiendo a los dos casos diagnosticados de EG tipo 2 y un caso de EG tipo 3. Por lo tanto en relación al total de pacientes vivos identificados en el registro con edad inferior a los 14 años al diagnóstico, un 82.9% de los individuos afectados de EG con diagnóstico en la edad pediátrica en España se encuentran en la actualidad recibiendo TES. La edad media de inicio del tratamiento se retrasa hasta los 14.6 ± 10.4 años al existir casos diagnosticados en los años anteriores a la existencia del TES. La distribución por grupos de edad al inicio del TES es la siguiente:

- RESULTADOS -

≤ 5 años (n=9): 23.1%
6 – 10 años (n=5): 12.8%
11 – 14 años (n=7): 17.9%
14 – 18 años (n=8): 20.5%
> 18 años (n=10): 25.6%

En la Figura 13 se presenta la distribución por grupos de edad al inicio del TES.

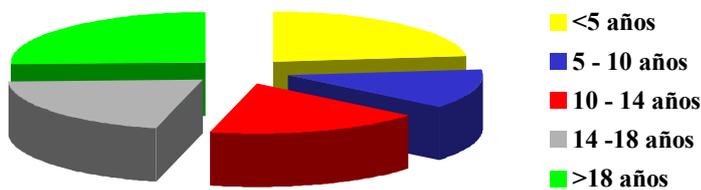


Figura 13. Distribución por grupos de edad al inicio del TES.

En la actualidad (Octubre de 2001) el tiempo medio transcurrido de TES en los 39 pacientes con diagnóstico en edad pediátrica es de 57.2 ± 21.4 meses con un rango de 17 – 95 meses.

2.2 Respuesta en las visceromegalias

La reducción del tamaño hepático y esplénico ha seguido un comportamiento similar en los pacientes estudiados.

2.2.1 Hepatomegalia

En la Tabla 35 se presenta las comparaciones del grado de hepatomegalia entre los distintos controles establecidos con el grado de significación estadística. En la Figura 14 se presenta de forma gráfica la respuesta en el tamaño hepático durante los tres primeros años de tratamiento.

Tabla 35. Respuesta en el tamaño hepático

Controles	Control 1° *	Control 2° *	p
0 – 3 meses (n=28)	6.8 ± 6.9	5.1 ± 6.8	0.000
3 – 6 meses (n=26)	5.2 ± 7.1	4.5 ± 6.8	0.001
6 – 12 meses (n=28)	4.3 ± 6.6	3.5 ± 6.1	0.000
12 – 18 meses (n=22)	4.1 ± 6.8	4.4 ± 7.1	0.324
12 – 24 meses (n=19)	3.6 ± 5.9	2.3 ± 4.3	0.150
18 – 24 meses (n=18)	4.1 ± 6.4	1.8 ± 4	0.057
24 – 36 meses (n=16)	2.1 ± 4.2	1.8 ± 5.2	0.342

* Resultados expresados en centímetros bajo el reborde costal (media ± desviación estándar)

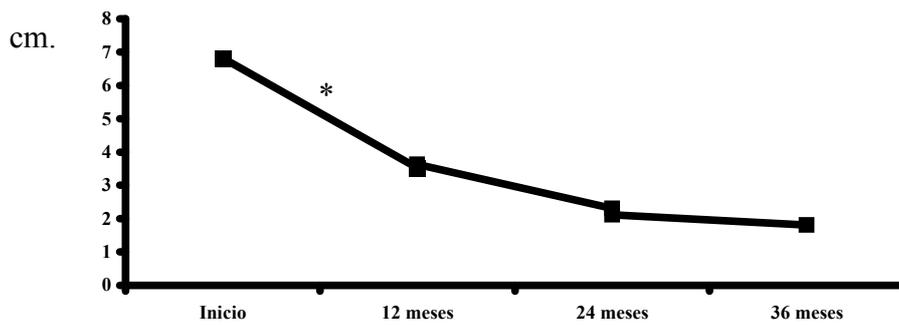


Figura 14. Respuesta del tamaño hepático.

*p<0.001

Dado que la reducción del tamaño hepático como se aprecia en la Figura 14 acontece durante el primer año de TES, en la Figura 15 se presenta la evolución durante el primer año, analizando la reducción existente a los 3, 6 y 12 meses.

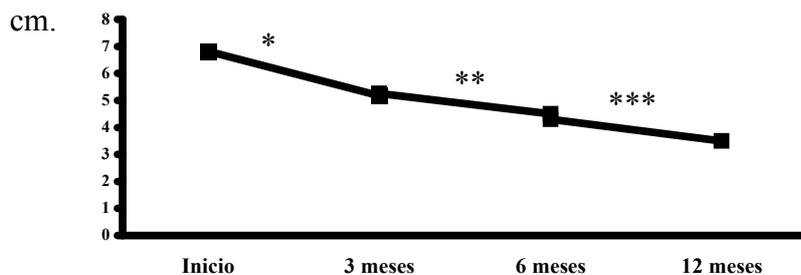


Figura 15. Respuesta del tamaño hepático durante el primer año de TES.

*p<0.001; **p=0.001; ***p<0.001.

2.2.2 Esplenomegalia

En la Tabla 36 se presenta las comparaciones del grado de esplenomegalia entre los distintos controles establecidos con el grado de significación estadística. En la Figura 16 se presenta de forma gráfica la respuesta en el tamaño hepático durante los tres primeros años de tratamiento.

Tabla 36. Respuesta en el tamaño esplénico

Controles	Control 1° *	Control 2° *	p
0 – 3 meses (n=24)	14 ± 9.4	10.8 ± 10	0.000
3 – 6 meses (n=22)	9.8 ± 9.5	8.2 ± 8.3	0.012
6 – 12 meses (n=24)	8 ± 8.1	5.6 ± 6.5	0.000
12 – 18 meses (n=20)	7.3 ± 8	6.5 ± 8.1	0.064
12 – 24 meses (n=19)	7.6 ± 8.1	7.1 ± 7.9	0.171
18 – 24 meses (n=19)	6.8 ± 8.2	7.1 ± 7.9	0.409
24 – 36 meses (n=17)	7.9 ± 8	6.4 ± 8.3	0.074

* Resultados expresados en centímetros bajo el reborde costal (media ± desviación estándar)

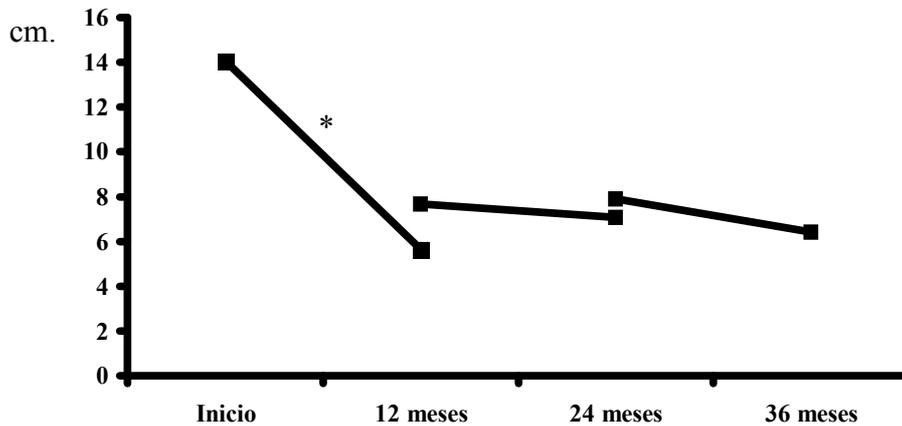


Figura 16. Respuesta del tamaño esplénico.

*p<0.001

Dado que la reducción del tamaño esplénico como se aprecia en la Figura 16 acontece durante el primer año de TES, en la Figura 17 se presenta la evolución durante el primer año, analizando la reducción existente a los 3, 6 y 12 meses.

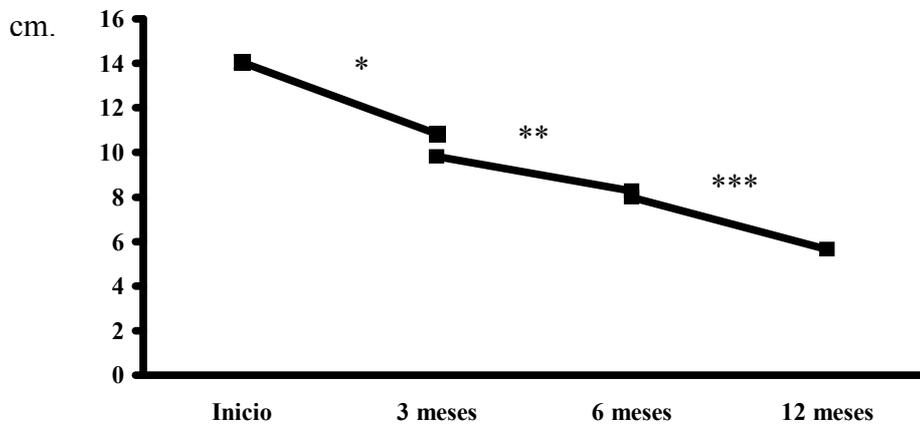


Figura 17. Respuesta del tamaño esplénico durante el primer año de TES.

* $p < 0.001$; ** $p = 0.001$; *** $p < 0.001$.

2.3 Respuesta en el crecimiento

En 15 pacientes en tratamiento se determinó el Z-score de talla al inicio del mismo y a los 13 \pm 5.6 meses; pasando el Z-score de talla de -1.65 ± 1.3 a -1.25 ± 0.96 ($p = 0.012$). En 8 pacientes se analizó la respuesta durante el segundo año de tratamiento; en este grupo el Z-score se incremento de -0.9 ± 0.68 a -0.66 ± 0.83 , si bien las diferencias no eran significativas ($p = 0.10$). En la Figura 18 se presenta la evolución del Z-score de talla.

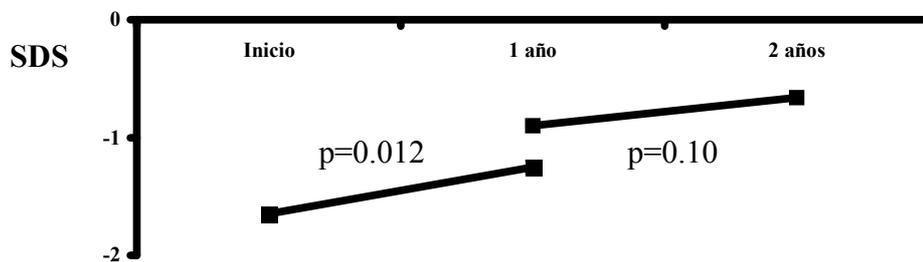


Figura 18. Respuesta del Z-score de talla al TES

2.4 Respuesta hematológica

Se ha analizado la respuesta en los niveles de hemoglobina y recuento plaquetario. Para ello se presentan en primer lugar el porcentaje de casos patológicos en cada control establecido y a continuación el seguimiento de aquellos casos con niveles alterados antes de iniciarse el tratamiento.

2.4.1 Hemoglobina

El porcentaje de casos que presentan niveles de hemoglobina inferiores a 11 g/dL se reduce de forma manifiesta durante el primer año de tratamiento. Así, si inicialmente un 45.6% (21/46) presentan niveles inferiores a 11 g/dL, a los 3 meses el porcentaje es de 30.7% (8/26), si bien no existen diferencias significativas ($p=0.201$); a los 6 meses sólo un 6.6% (2/30) presentan niveles inferiores a 11 g/dL, existiendo ya diferencias significativas en relación con el porcentaje inicial ($p<0.001$). A los 12 meses existe un 13.7% (4/29) sin que dicho incremento sea significativo ($p=0.364$). Durante el segundo año existe una nueva reducción porcentual hasta un 0% (0/22) con diferencias significativas en relación al control establecido al año de tratamiento ($p=0.031$). Finalmente a los 3 años de tratamiento un 5.5% (1/18) presentan niveles de hemoglobina disminuidos ($p=0.303$). En la Figura 19 se resumen la evolución de casos patológicos en relación a los niveles de hemoglobina.

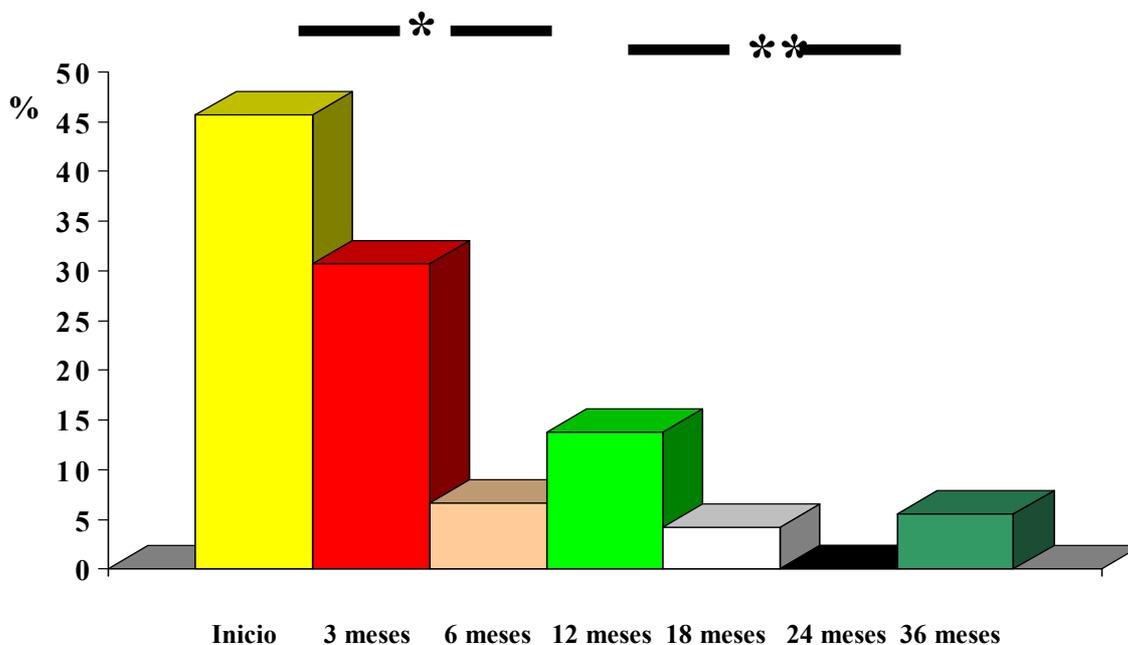


Figura 19. Porcentaje de pacientes con niveles de hemoglobina < 11 g/dL

* $p<0.001$; ** $p=0.031$.

- RESULTADOS -

En la Tabla 37 se analiza la respuesta en los niveles de hemoglobina en aquellos pacientes que presentaban antes de iniciarse el tratamiento niveles inferiores a 11 g/dL, para ello se establecieron comparaciones estadísticas entre los distintos controles establecidos. En la Figura 20 se presenta de forma gráfica la respuesta de los niveles de hemoglobina durante los tres primeros años de tratamiento.

Tabla 37. Respuesta en pacientes con niveles de hemoglobina < 11 g/dL

Controles	Control 1º *	Control 2º *	p
0 – 3 meses (n=15)	9.7 ± 1.1	10.8 ± 1.4	0.001
3 – 6 meses (n=14)	10.9 ± 1.4	12.3 ± 1	0.002
6 – 12 meses (n=16)	12.1 ± 0.9	12.3 ± 0.9	0.323
12 – 18 meses (n=15)	12.1 ± 1	12.4 ± 0.9	0.068
12 – 24 meses (n=13)	11.9 ± 0.8	12.4 ± 0.7	0.069
18 – 24 meses (n=13)	12.3 ± 0.9	12.4 ± 0.7	0.479
24 – 36 meses (n=10)	12.4 ± 0.8	12.1 ± 1.1	0.282

* Resultados expresados en g/dL (media ± desviación estándar).

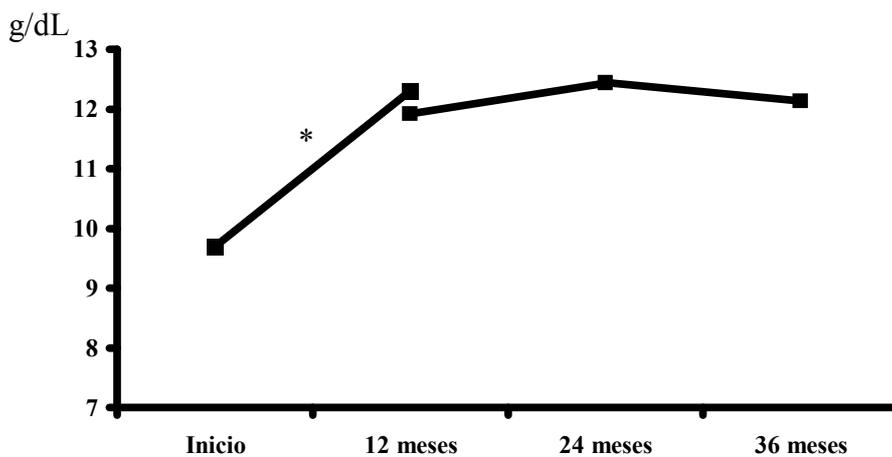


Figura 20. Evolución de los niveles de hemoglobina durante el TES.

* p<0.001

Dado que el incremento en los niveles de hemoglobina como se aprecia en la Figura 20 acontece durante el primer año de TES, en la Figura 21 se presenta la evolución durante el primer año, analizando el incremento existente a los 3, 6 y 12 meses.

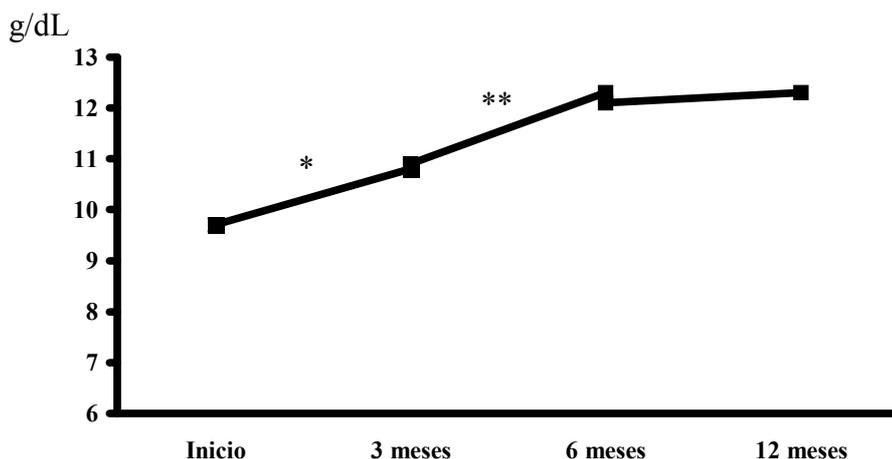


Figura 21. Evolución de los niveles de hemoglobina durante el primer año de TES.

*p=0.001; **p=0.002.

2.4.2 Recuento plaquetario

El porcentaje de casos que presentan recuentos plaquetarios inferiores a $100 \times 10^9/L$ se reduce durante el primer año de tratamiento. Así, si inicialmente un 46.8% (22/47) presentan recuentos inferiores a $100 \times 10^9/L$, a los 3 meses el porcentaje es de 30.7% (8/26), si bien no existen diferencias significativas ($p=0.167$); a los 6 meses no existen cambios en relación al control anterior ya que un 30% (9/30) presentan recuentos inferiores a $100 \times 10^9/L$. Sin embargo es a los 12 meses cuando existe un descenso significativo ya que sólo un 13.7% (4/29) presentan recuentos inferiores a $100 \times 10^9/L$ ($p=0.003$). Durante el segundo año no existen modificaciones ya que un 14.2% de pacientes presentan recuentos plaquetarios disminuidos ($p=0.775$). Finalmente a los 3 años de tratamiento un 11.1% (2/18) presentan recuentos disminuidos ($p=0.765$). En la Figura 22 se resumen la evolución de casos patológicos en relación a los recuentos plaquetarios.

- RESULTADOS -

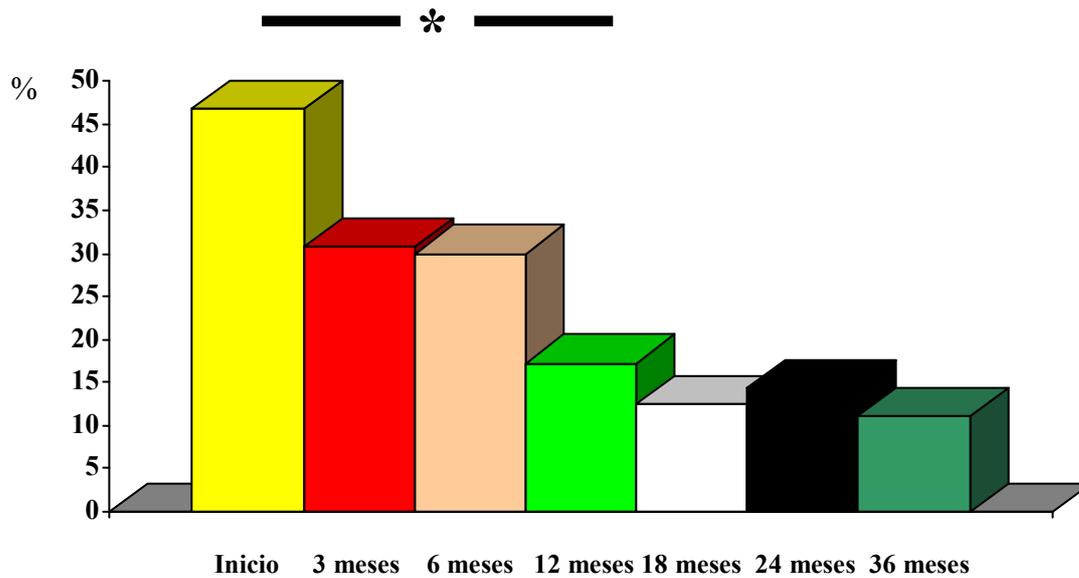


Figura 22. Porcentaje de pacientes con recuento plaquetario $< 100 \times 10^9/L$

* $p=0.003$

En la Tabla 38 se analiza la respuesta del recuento plaquetario en aquellos pacientes que presentaban antes de iniciarse el tratamiento recuentos inferiores a $100 \times 10^9/L$, para ello se establecieron comparaciones estadísticas entre los distintos controles establecidos. En la Figura 23 se presenta de forma gráfica la respuesta del recuento plaquetario durante los tres primeros años de tratamiento.

Tabla 38. Respuesta en pacientes con recuentos plaquetarios $< 100 \times 10^9/L$

Controles	Control 1° *	Control 2° *	p
0 – 3 meses (n=12)	51.5 ± 32.9	72.7 ± 45.8	0.009
3 – 6 meses (n=12)	74.6 ± 44.7	86 ± 44.9	0.092
6 – 12 meses (n=12)	89.9 ± 42	107.7 ± 48	0.010
12 – 18 meses (n=11)	109 ± 57.6	126.2 ± 64.8	0.184
12 – 24 meses (n=9)	113.2 ± 50	126.8 ± 52	0.260
18 – 24 meses (n=10)	123.5 ± 67.6	118.5 ± 55.8	0.858
24 – 36 meses (n=9)	113.5 ± 56.8	123.4 ± 56.7	0.085

* Resultados expresados en $\times 10^9/L$ (media \pm desviación estándar).

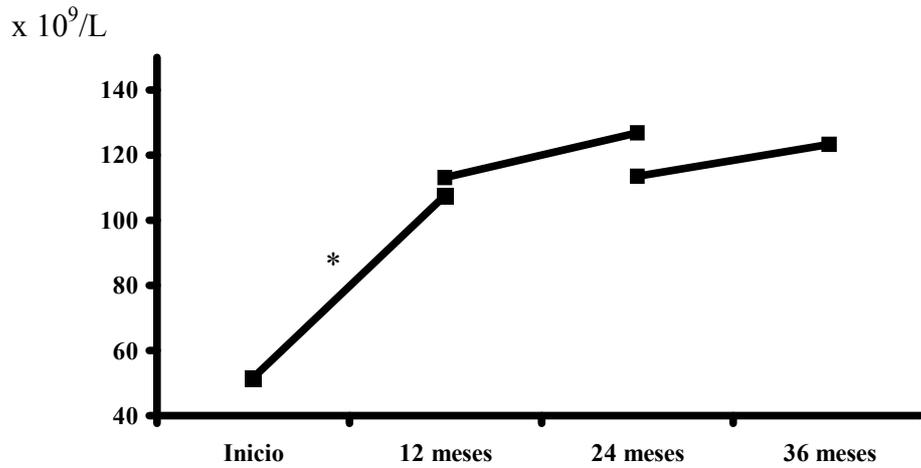


Figura 23. Evolución del recuento plaquetario durante el TES.

* p=0.003

Dado que el incremento en los recuentos plaquetarios como se aprecia en la Figura 23 acontece durante el primer año de TES, en la Figura 24 se presenta la evolución durante el primer año, analizando el incremento existente a los 3, 6 y 12 meses.

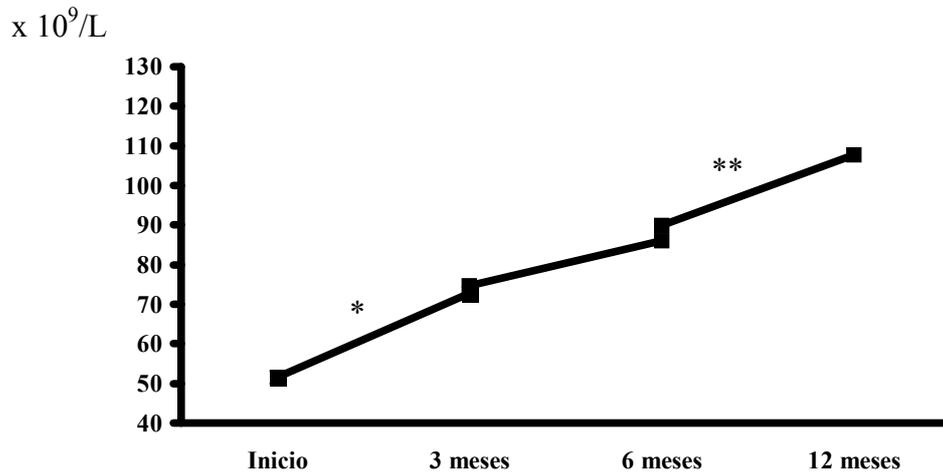


Figura 24. Evolución del recuento plaquetario durante el primer año de TES.

*p=0.009; **p=0.010.

2.5 Cambios en el perfil lipídico

Se ha analizado la evolución de los niveles de colesterol total durante los tres primeros años de tratamiento y de la fracción HDL colesterol y el IA (Colesterol total / HDL colesterol) durante los dos primeros años de tratamiento.

Los niveles de colesterol total sufren un incremento moderado aunque significativo durante el primer año de tratamiento para posteriormente no experimentar modificaciones como se puede apreciar en la Tabla 39. En la Figura 25 se presenta de forma gráfica la evolución de los niveles de colesterol total.

Tabla 39. Colesterol total durante el TES

Controles	Control 1º *	Control 2º *	p
0 – 12 meses (n=12)	123± 36.6	136 ± 33.1	0.031
12 – 24 meses (n=12)	134 ± 27.9	132 ± 28.9	0.333
24 – 36 meses (n=12)	139 ± 29.9	137 ± 36.7	0.550

* Resultados expresados en mg/dL (media ± desviación estándar).

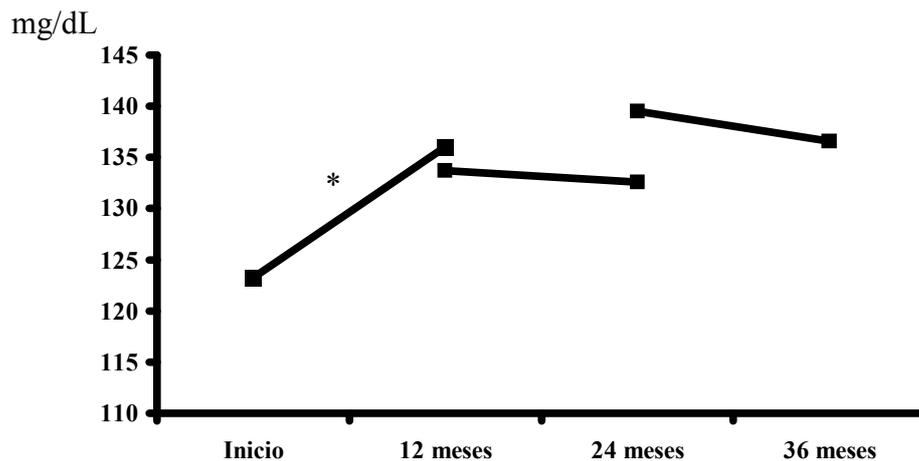


Figura 25. Evolución del colesterol total durante el TES.

* p=0.031

- RESULTADOS -

En una muestra de 11 pacientes se determinó HDL colesterol y se calculó el IA (colesterol total/HDL colesterol) al inicio del tratamiento y a los 15 ± 7.9 meses. En 8 pacientes se realizó un tercer control a los dos años de iniciado el tratamiento. En la Tabla 40 se presentan los cambios experimentados en los niveles de HDL colesterol y en el IA en los controles establecidos en los pacientes incluidos. En las Figuras 26 y 27 se presenta de forma gráfica la evolución de dichos parámetros.

Tabla 40. HDL colesterol e IA durante el TES

Controles	Control 1°	Control 2°	p
HDL colesterol*			
0 – 15 ± 7.9 meses (n=11)	22 ± 4.2	34 ± 10.3	<i>0.003</i>
12 – 24 meses (n=8)	32 ± 10.9	32 ± 10.2	0.910
IA			
0 – 15 ± 7.9 meses (n=11)	5.5 ± 1.0	4.4 ± 1.4	<i>0.003</i>
12 – 24 meses (n=8)	4.5 ± 1.5	4.7 ± 2.2	0.350

* Resultados expresados en mg/dL (media \pm desviación estándar).

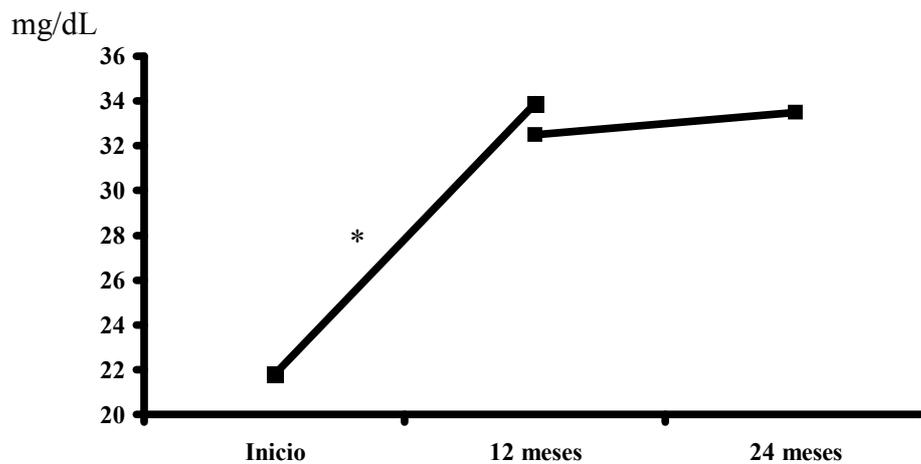


Figura 26. Evolución del HDL colesterol durante el TES.

* $p=0.003$

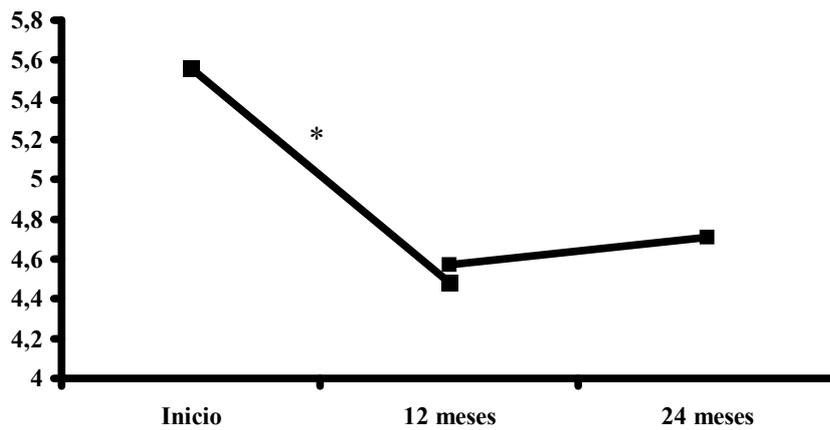


Figura 27. Evolución del IA durante el TES.

* $p=0.003$

2.6 Respuesta de los marcadores enzimáticos de actividad de la enfermedad

2.6.1 Fosfatasa ácida

En la Tabla 41 se presenta las comparaciones de los niveles de fosfatasa ácida entre los distintos controles establecidos con el grado de significación estadística. En la Figura 28 se presenta de forma gráfica la respuesta en los niveles de fosfatasa ácida durante los tres primeros años de tratamiento.

Tabla 41. Respuesta en los niveles de Fosfatasa ácida

Controles	Control 1° *	Control 2° *	p
0 – 3 meses (n=14)	27 ± 12.5	18 ± 10.7	0.001
3 – 6 meses (n=12)	17 ± 9.2	14 ± 7	0.091
6 – 12 meses (n=17)	14 ± 6.6	10 ± 4.9	0.000
12 – 18 meses (n=14)	11 ± 5.6	13 ± 11.7	0.694
12 – 24 meses (n=12)	11 ± 4.6	10 ± 5	0.387
18 – 24 meses (n=13)	14 ± 12	10 ± 5.8	0.130
24 – 36 meses (n=10)	11 ± 6.2	12 ± 8.3	0.358

* Resultados expresados en U/L (media ± desviación estándar)

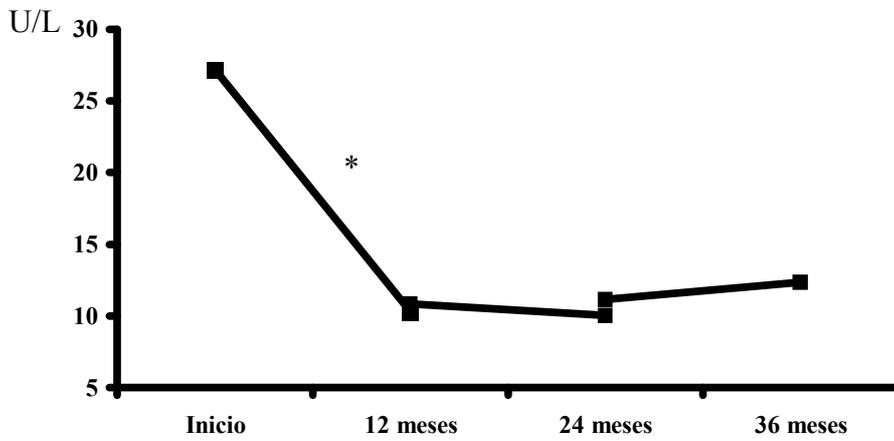


Figura 28. Evolución de los niveles de fosfatasa ácida durante el TES.

* $p < 0.001$

Dado que el descenso en los niveles de fosfatasa ácida como se aprecia en la Figura 28 acontece durante el primer año de TES, en la Figura 29 se presenta la evolución durante el primer año, analizando el incremento existente a los 3, 6 y 12 meses.

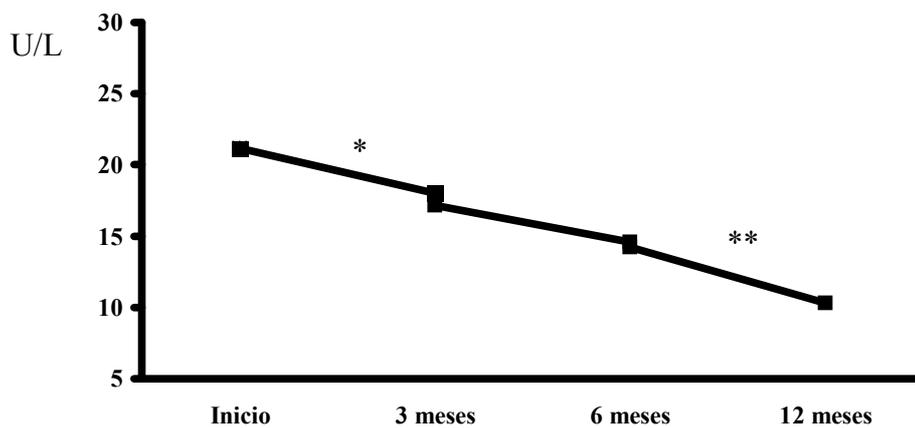


Figura 29. Evolución de los niveles de fosfatasa ácida durante el primer año de TES.

* $p = 0.001$; ** $p < 0.001$.

2.6.2 Actividad de QT

Se ha analizado la actividad de quitotriosidasa durante los 4 primeros años de TES, realizándose la comparación de dicha actividad entre los distintos controles establecidos como se indica en la Tabla 42. Igualmente se establece el porcentaje de reducción de la actividad dado que este es el criterio utilizado al valorar la respuesta positiva al TES.

En la Figura 30 se representa de forma gráfica la evolución de la actividad de quitotriosidasa tanto sin TES como durante el mismo.

Tabla 42. Respuesta de la actividad de QT al TES

Intervalo	Control 1° *	Control 2° *	p	% reducción
0 – 6 meses (n=7)	29771 ± 16858	16383 ± 8097	0.042	↓ 33.3 ± 37.7
0 – 1 año (n=16)	26172 ± 13272	8885 ± 6558	0.000	↓ 65.2 ± 21.8
1 – 2 años (n=17)	8774 ± 6296	6434 ± 5910	0.000	↓ 31.6 ± 21.8
2 – 3 años (n=11)	6419 ± 5980	6403 ± 5634	1	↑ 8.24 ± 44
3 – 4 años (n=8)	8072 ± 5793	5805 ± 4269	0.035	↓ 23 ± 23

* Resultados expresados en nM/mL.h (media ± desviación estándar)

En los 8 pacientes en los que se determinó la actividad de QT durante un año antes de iniciarse el TES encontramos una actividad inicial de 20222 ± 16158 y al año de 17526 ± 10958 (p=0.400), si bien expresado en porcentaje existía un incremento no significativo de 7.9 ± 51.5%.

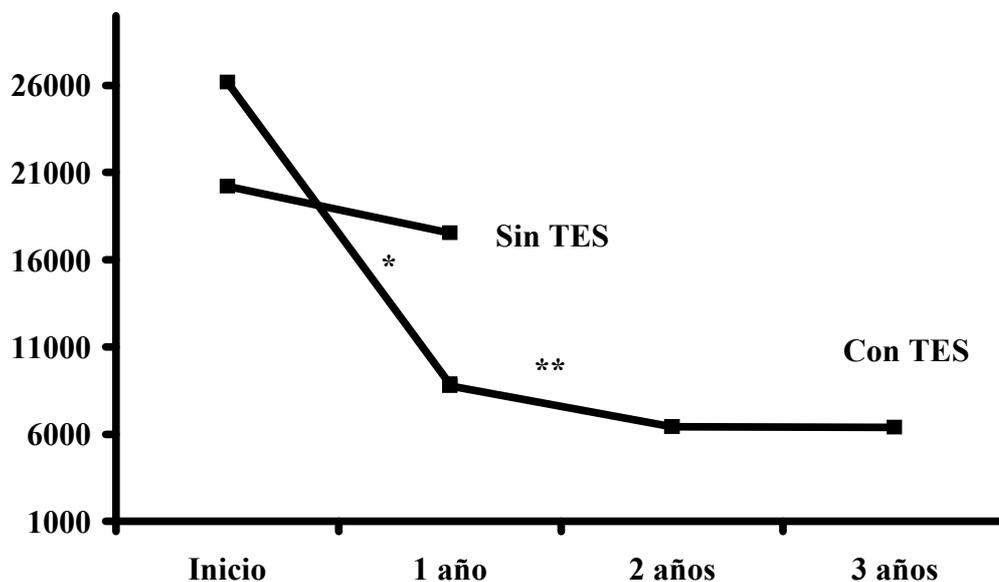


Figura 30. Evolución de la actividad de QT con y sin TES

* $p < 0.001$; ** $p < 0.001$

2.7. Respuesta del sistema IGF

Se analizaron los cambios en el eje durante los dos primeros años de tratamiento. IGF-1 total se incrementó de -1.8 ± 0.8 a -0.8 ± 1.4 SDS ($p=0.005$) y IGF-1 libre de -1.2 ± 1 a 1.1 ± 2.1 SDS ($p=0.011$) a los 12 ± 6.8 meses de iniciarse el TES en diez pacientes.

Cuando analizamos las proteínas transportadoras encontramos el mismo comportamiento. IGFBP-3 sufrió un incremento de -1.3 ± 0.6 a -0.2 ± 1.2 SDS ($p=0.012$) a los 12 ± 4.5 meses de iniciarse el TES en 8 pacientes y finalmente ALS total pasó de 31.2 ± 8.9 a 53 ± 11.9 mcg/mL ($p=0.018$) en 7 pacientes estudiados (Tabla 43). En la Figura 31 se presenta de forma gráfica los cambios en los IGFs durante el TES.

En 8 pacientes la IGF-1 total se incrementó de -1.3 ± 0.7 a -0.5 ± 0.8 en el segundo año ($p=0.012$). No se encontraron cambios significativos durante el segundo año para IGF-1 libre, IGFBP-3 y ALS total.

Tabla 43. Cambios en eje IGF durante el TES.

	Antes del TES	Durante el TES	meses (media \pm SD)	p	n
IGF-1 total (SDS)	-1.8 \pm 0.8	-0.8 \pm 1.4	12 \pm 6.8	0.005	10
IGF-1 libre (SDS)	-1.2 \pm 1	1.1 \pm 2.1	12 \pm 6.8	0.011	10
IGFBP-3 (SDS)	-1.3 \pm 0.6	-0.2 \pm 1.2	12 \pm 4.5	0.012	8
ALS total (mcg/mL)	31.2 \pm 8.9	53 \pm 11.9	8.1 \pm 3	0.018	7

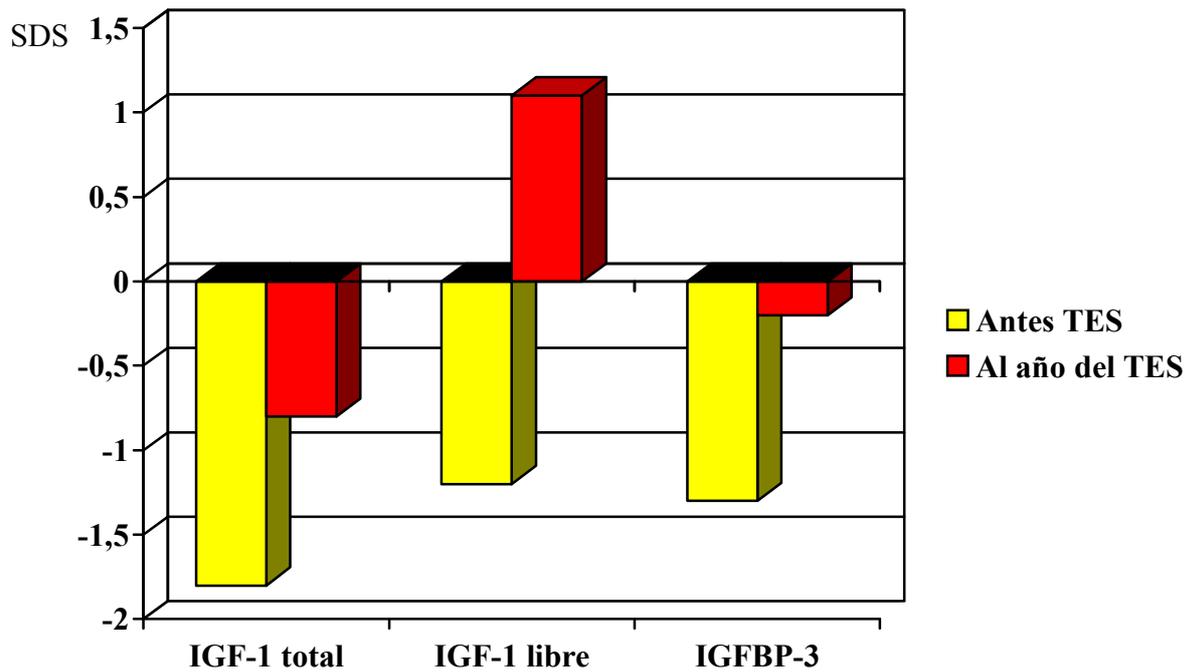


Figura 31. Cambios en el eje IGF durante el primer año de tratamiento

DISCUSIÓN

La variabilidad en la expresión clínica de los pacientes afectados de EG condiciona que en una mayoría de casos el diagnóstico se efectúe en la segunda y tercera década de la vida y en ocasiones en edad más avanzada (141). Sin embargo un porcentaje no despreciable de casos, inician sus manifestaciones clínicas en edad temprana y son diagnosticados por lo tanto en la etapa infantil.

En este estudio hemos considerado para el análisis aquellos pacientes que desarrollaron sus manifestaciones y por tanto fueron diagnosticados en edad pediátrica, existiendo pacientes diagnosticados en la infancia que han completado su crecimiento que ahora son adultos jóvenes, iniciando el TES a edad superior a los 18 años y otros pacientes que han sido diagnosticados en la infancia a partir del año 1993, momento en el que se pudo disponer en España del TES. En este último grupo disponemos por tanto de datos antropométricos así como datos analíticos de indicadores del crecimiento (sistema IGF) previos a la instauración del TES y en el seguimiento evolutivo de estos niños.

1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, ANALÍTICAS Y GENÉTICAS DE LA EG CON INICIO EN EDAD PEDIÁTRICA

1.1 Características demográficas

Al igual que en la última actualización del REEG (157), en nuestra muestra el mayor porcentaje de casos procede de Andalucía (24%), localizándose hasta un 66% en regiones mediterráneas y Aragón.

La edad media al diagnóstico de los pacientes españoles con EG, según datos del REEG es de 24 ± 16.9 años (157), si bien hay que destacar que en los últimos años se identifica una tendencia al diagnóstico precoz de la enfermedad, incluso de casos asintomáticos detectados en el curso de la realización de estudios familiares. La edad media al diagnóstico en el Registro Internacional es de 17.4 años (141). En la mayoría de los casos va a ser el genotipo de los pacientes lo que va a condicionar la edad de diagnóstico. La presencia la mutación N370S en homocigosis está asociada a un diagnóstico más tardío (34,168,169) porque confiere más benignidad a la enfermedad, sin embargo se ha comprobado en el Registro Internacional de EG (141) como se está produciendo un diagnóstico más temprano (27.2 años por término medio) de estos pacientes en relación a estudios previos (170), este hecho puede justificarse por la realización de estudios familiares (171) y por los programas de búsqueda en población

sana de origen judío(35). En los individuos heterocigotos para la mutación N370S la gravedad de la enfermedad viene determinada por las características del otro alelo defectuoso. Cuando la mutación N370S se encuentra en heterocigosis con otras mutaciones (a excepción de 84GG o deleciones / recombinaciones) el diagnóstico oscila entre los 16 y 20 años de edad; situándose más próximo a los 16 años cuando se presenta con la mutación L444P (141). En nuestra población no hemos encontrado diferencias significativas en la edad de diagnóstico entre aquellos individuos con genotipo N370S/L444P y el resto de individuos con otros genotipos. Sin embargo hay que destacar que entre los individuos diagnosticados antes de los 14 años sólo existe un caso con genotipo N370S/N370S (2%) cuando en el grupo de pacientes españoles representa un 23% (157). En nuestra población, como cabría esperar, es el tipo de EG la condición que más se asocia a un diagnóstico más temprano de la enfermedad. Un 10% de los pacientes de nuestra serie fueron diagnosticados antes del año de edad; correspondiendo 2 casos a EG tipo 2 y 1 caso a EG tipo 3. Los otros dos casos cumplían criterios clínicos de EG tipo 1 al no presentar afectación neurológica, si bien sus genotipos eran L444P/L444P y D409H/D409H, ambos de riesgo para que en su evolución puedan desarrollar dicha afectación.

En cuanto a los tipos de la EG, puede llamar la atención la existencia de sólo 6 casos diagnosticados como formas neuronopáticas de la enfermedad; probablemente la frecuencia sea mayor y un número desconocido de pacientes no sean diagnosticados. Este es un hecho constatado por algunos autores en relación a la EG tipo 2, hoy en día se discute si posiblemente los recién nacidos que presentan la variante de la enfermedad con ictiosis congénita o también conocida como forma letal perinatal sea la más frecuente dentro del espectro de EG tipo 2, dado que su frecuencia real puede encontrarse subestimada debido a que muchos casos son diagnosticados de collodion baby o hydrops de origen desconocido (285). Por tanto es posible que exista un número de casos de EG tipo 2 que no sean diagnosticados.

1.2 Características clínicas y analíticas

1.2.1 Retraso de crecimiento

En relación a las características clínicas de los pacientes pediátricos el aspecto más importante que se ha analizado es el retraso de crecimiento y las posibles causas que lo motivan. En la actualidad se reconoce que el retraso de crecimiento parece ser de gran

- DISCUSION -

valor a la hora de determinar la gravedad así como el grado de progresión de la EG en los niños (204,245). Hasta la fecha el retraso de crecimiento es un hecho constatado por múltiples autores, sin embargo no ha sido suficientemente estudiado. Su prevalencia es muy elevada entre los niños afectos de EG, según series la mitad de los niños con EG tipo I presenta evidencia antropométrica de retraso de crecimiento. En nuestra población hemos constatado como un 42% de los niños estudiados se sitúan por debajo del percentil 3 de nuestros estándares de normalidad. Incluso un porcentaje elevado de pacientes en la serie de Kaplan (22%) presentan un patrón de crecimiento normal, pero pobre en relación a la talla diana familiar (262). Encontró tres patrones de crecimiento; en un 28% el patrón de crecimiento era normal en relación a la población general y la talla de los padres. En un 22% el patrón de crecimiento era normal en relación a la población general pero disminuido en relación a la familia. Hasta en un 50% de la serie de Kaplan el patrón de crecimiento era anormal en relación con la población general y con la familia del niño. Es un hecho bastante frecuente entre los niños diagnosticados de EG que el retraso de crecimiento constituya la única manifestación de la enfermedad (245).

Como se señaló en la Introducción se ha demostrado como el retraso de crecimiento acontece fundamentalmente entre los 3 y 7 años. En el 52.6% de niños seguidos por el grupo de Kauli (263) desde el primer año de vida se objetivó una desaceleración del crecimiento a los 3 – 5 años de edad. La talla pasó de 0.34 SDS a la edad de 0-3 años a -1.93 ($p < 0.01$) a la edad de 7-10 años y la caída era más pronunciada en relación a la gravedad de la enfermedad.

Por otro lado el origen del retraso de crecimiento sigue sin estar suficientemente aclarado, si bien Kaplan encontró una correlación significativa entre el tamaño hepático y el retraso de crecimiento (262); lo que podría suponer que la disfunción hepática pudiera estar influyendo en el pobre crecimiento que presentan estos pacientes. En nuestra población la correlación con el tamaño hepático era también negativa pero no significativa ($r = -0.22$). No hemos encontrado una relación entre los parámetros clásicos de función hepática y el retraso de crecimiento que presentan los pacientes de nuestra cohorte. Sin embargo en nuestra muestra existe una correlación negativa significativa aunque moderada (-0.51) entre el tamaño esplénico y la talla antes de iniciarse el tratamiento; hecho ya constatado por otros autores que han comprobado como el retraso

- DISCUSION -

de crecimiento es paralelo a la gravedad de la enfermedad medida por otros parámetros (245). En este sentido en nuestra población hemos encontrado una correlación moderada también negativa (-0.44) entre la actividad de QT y la talla antes de iniciarse el tratamiento; hecho importante ya que hemos comprobado anteriormente como la actividad de QT se asocia con la gravedad de la enfermedad antes de iniciarse el tratamiento. Finalmente en relación al genotipo hemos encontrado una asociación igualmente moderada entre la talla y la existencia de la mutación L444P (-0.43), teóricamente asociada a un peor pronóstico cuando está presente en individuos con EG tipo I.

Asociado al retraso de crecimiento los niños que desarrollan la EG en los primeros años de vida presenta con frecuencia una pubertad retrasada; hasta un 59.6% en la serie de Kauli (263); si bien en todos los casos existe finalmente una maduración sexual completa.

El origen de este pobre crecimiento en los pacientes pediátricos afectos de EG tipo I no está suficientemente aclarado. Dentro de las múltiples causas que originan baja talla patológica cabe destacar dos grandes grupos: de inicio prenatal y de inicio postnatal. Son múltiples las causas dentro de este segundo grupo que pueden originar retraso de crecimiento (malnutrición, infecciones recurrentes, anomalías endocrinológicas, patología crónica,...) (460). Si bien cabe la posibilidad de que el retraso de crecimiento en la EG pueda ser de origen genético y de hecho hemos visto como en nuestra población se asocia fundamentalmente a la mutación L444P; es más probable que su origen sea semejante al de otras patologías crónicas, fundamentalmente con disfunción hepática. El retraso de crecimiento ha sido documentado en otras metabopatías como glucogenosis, mucopolisacaridosis, lipoidosis y aminoacidopatías.

En nuestra cohorte hemos estudiado los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs). Dichos factores peptídicos son importantes determinantes del crecimiento somático (461). Además estudios recientes han demostrado que los IGFs tienen un papel anabólico importante incluso en adultos (462), estimulando la síntesis proteica en todo el organismo. El descubrimiento de los IGFs es en 1957 (463) tras observar que el efecto estimulador de la hormona de crecimiento (GH) sobre la incorporación de radicales sulfato a la matriz del cartílago estaba mediado por una fracción del suero que

- DISCUSION -

se denominó factor de sulfatación. Durante los años siguientes se identificaron otras fracciones del suero que eran igualmente dependientes de la hormona de crecimiento y a todas ellas se las denominó genéricamente como “somatomedinas” en base a tres propiedades biológicas: a) capacidad para incorporar radicales sulfato y estimular la síntesis de DNA a nivel del cartílago, b) actividad insulínica, por estimular la captación de glucosa y aminoácidos en el tejido adiposo y muscular y c) actividad mitogénica en cultivos celulares. Así pues, el término somatomedinas se ideó para describir el papel que tienen estas sustancias como mediadores de las acciones de la GH. Posteriormente, en 1978, se identifican dos péptidos de estructura similar a la insulina y que poseían las actividades biológicas descritas inicialmente para las somatomedinas (464). Aunque claramente distintos estos dos péptidos tenían una homología del 70% en su secuencia de aminoácidos lo que hacía pensar en un precursor común; también se observó que tenían un 50% de homología con la proinsulina. Esta semejanza estructural y la similitud de acciones in vitro con la insulina llevó a Rinderknecht y Humbel a denominarles factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs). Con objeto de evitar confusiones se llegó al consenso internacional de hablar de IGF-I e IGF-II para referirse a las somatomedinas (465). El hallazgo de que la GH es capaz de estimular a nivel de múltiples tejidos, además del hígado, la producción local de IGFs y la observación de que en algunos tejidos la producción de IGFs es independiente de la GH, otorgan a los IGFs una función autocrina y/o paracrina en el crecimiento celular ampliando así la hipótesis clásica de la somatomedina. De esta manera se puede definir a los IGFs como unos péptidos de estructura similar a la insulina que actúan regulando el crecimiento y la diferenciación celular a nivel de múltiples tejidos. Se engloban conceptualmente dentro de los factores de crecimiento polipeptídicos. Estos son proteínas que a diferencia de las hormonas son liberados por múltiples tejidos, se encuentran en cualquier lugar del organismo, actúan localmente sobre las propias células secretoras o sobre las células vecinas, mediante lo que se conoce como mecanismo autocrino y paracrino respectivamente, y son mensajeros intracelulares capaces de estimular procesos de crecimiento y diferenciación celular como síntesis de proteínas, DNA y RNA. Entre otros se encuentran los IGFs, el factor de crecimiento transformador (TGF), epidérmico (EGF), fibroblástico (FGF), neural (NGF), factor estimulador de la formación de colonias (CSF), citocinas,... Todos ellos constituyen un gran sistema regulador del crecimiento celular de gran complejidad y que se encarga de procesos tan complejos como el crecimiento celular normal, reparación de las heridas,

diferenciación embrionaria, envejecimiento celular y procesos de transformación maligna (465).

En la actualidad se habla del denominado “sistema IGF”, constituido por cuatro tipos de proteínas: los propios IGFs, sus receptores, las proteínas transportadoras (IGFBPs) y las proteasas de las IGFBPs que permiten la liberación de los IGFs. Los IGFs, a diferencia del resto de factores polipeptídicos puede ejercer una acción a distancia a nivel endocrino ya que son vehiculizadas por los IGFBPs. Esta capacidad endocrina otorga a los IGFs y alas IGFBPs un papel importante a nivel clínico, ya que su determinación plasmática es útil para el diagnóstico de distintas situaciones patológicas (466).

En los pacientes con EG de nuestra cohorte hemos analizado IGF-I, IGF-I libre y sus proteínas transportadoras IGFBP-3 y subunidad ácido lábil total (ALS).

IGF-I

El IGF-I es un peptido de 70 aminoácidos homólogo a la proinsulina humana, tiene un peso molecular de 7.6 kDa y es de cadena única. El gen del IGF-I se localiza a nivel del brazo largo del cromosoma 12 y consta de seis exones (466). Su síntesis tiene lugar como propérido. Estas formas inmaduras o variantes de los IGFs pueden encontrarse en la circulación en diferentes condiciones patológicas. En contraposición con la mayor parte de las hormonas proteicas, los IGFs se secretan a la vez que se sintetizan y no existe ningún órgano que los almacene. El hígado es la fuente principal de los IGFs circulantes y por consiguiente de IGF-I, pero su síntesis tiene lugar en prácticamente todos los tejidos (467). Al igual que las hormonas proteicas, los IGFs inician su acción biológica al unirse a unas proteínas o receptores de membrana. Se han identificado receptores en casi todos los tejidos y ello es concordante con la acción autocrina y paracrina de los IGFs. Se han identificado dos tipos de receptores para los IGFs, receptor tipo I y receptor tipo II (468). El receptor tipo I es un heterotetrámero de estructura similar al receptor de la insulina. El gen del receptor tipo I se localiza en el cromosoma 15. Este receptor tiene actividad tirosinkinasa. Posee dos subunidades alfa extracelulares que contiene abundante cisteína que es dónde tiene lugar la unión al IGF-I y dos subunidades beta. La porción intracitoplasmática de cada subunidad beta posee actividad tirosin kinasa de manera que la unión con IGF-I provoca la fosforilación de proteínas intracelulares encargadas de desencadenar la transmisión de la señal biológica.

- DISCUSION -

Este receptor se une fundamentalmente a la IGF-I, pero no exclusivamente, ya que ha mostrado afinidad, aunque significativamente menor por IGF-II e insulina (468,469).

En general IGF-I ejerce dos tipos de acciones: unas a corto plazo, de tipo anabólico, sobre el metabolismo proteico y de los carbohidratos, y otras a largo plazo, sobre el crecimiento y la diferenciación celular (469). IGF-I estimula la proliferación celular al mediar en la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Las células en reposo o quiescentes, fase G₀, requieren la estimulación de otros factores de crecimiento, llamados factores de competencia, que hacen que la célula entre en fase G₁ de síntesis proteica. Al aumentar entonces los receptores para IGF-I las células son capaces de responder a este y otros factores de progresión celular entrando en fase S de replicación del DNA y posteriormente en la fase M de mitosis (461,469). La acción más relevante del IGF-I es la estimulación del crecimiento postnatal y sus acciones se han detectado en la mayoría de los tejidos, especialmente a nivel esquelético. La acción conjunta de la GH y del IGF-I sobre los tejidos se conoce como acción “dual”: la GH actúa estimulando la diferenciación celular haciendo que esas células ya diferenciadas puedan secretar IGF-I, que al actuar localmente estimula el crecimiento celular. Además tiene capacidad para inhibir la muerte celular programada o apoptosis. En este sentido se ha relacionado el envejecimiento de los tejidos y el aumento de apoptosis que ocurre con la edad con la disminución de los niveles circulantes, y secundariamente tisulares de IGF-I en la edad adulta. Se ha demostrado también la capacidad de IGF-I en la regulación de la diferenciación celular en mioblastos, osteoblastos, osteoclastos, condroblastos, adipositos y células neurales. Así en los condrocitos, inicialmente y durante la fase de crecimiento logarítmico, estimula la síntesis de DNA, y en una segunda fase aumentan la síntesis de proteoglicanos y de otros componentes de la matriz cartilaginosa. Además estimula la esteroidogénesis, la síntesis de hormonas tiroideas,... Además como su propio nombre indica favorece el transporte de glucosa, su oxidación y la lipogénesis (469,470).

En cuanto a su regulación señalar que la GH es el mayor regulador de la síntesis de IGF-I tanto en sus niveles circulantes como tisulares (471,472). Sin embargo otros factores deben ser tenidos en cuenta: sus niveles son edad dependientes; son bajos al nacimiento, alcanzan valores máximos al final de la pubertad y posteriormente descienden de forma progresiva (470). Otras hormonas parecen tener un efecto

estimulador sobre la síntesis de IGF-1 como sería el caso de la prolactina, hormonas tiroideas, hormonas sexuales y paratohormona (470). El estado nutricional es un importante regulador del sistema IGF y concretamente de la IGF-I. La malnutrición proteico-calórica se acompaña de una disminución significativa de los niveles de IGF-I como tiene lugar en los síndromes de insensibilidad a la GH. De hecho la disminución de los niveles de IGF-I parece explicarse por la existencia de una resistencia a la acción de la GH (470). Por último sabemos que la principal fuente de IGF-I es el hígado. Los niveles de IGF-I guardan correlación alta con los marcadores de función hepática y se encuentran alterados en diversas enfermedades hepáticas (473,474).

IGFBP-3

Como hemos señalado una característica diferencial de los IGFs en relación a otros factores polipeptídicos es su capacidad de unión a los IGFBPs. Únicamente el 1% de los IGFs circula de forma libre. Hasta la fecha se han descrito 6 proteínas de unión a los IGFs. De ellas es la IGFBP-3 la que se conoce mejor su función. Es la más abundante en suero humano. Tras unirse a la IGF-I ó al IGF-II es capaz de unirse con la ALS formando un complejo ternario de 150 kDa. Se sintetiza fundamentalmente a nivel hepático pero también en múltiples tejidos. Presenta una alta afinidad por IGF-I, mayor que la de otras IGFBPs y los receptores. Los niveles de IGF-I e IGF-II dependen en gran medida de IGFBP-3 debido a que la vida media de sus formas libres es de 4 – 15 minutos y por ello sólo unidos a IGFBP-3 permanecen en la circulación. Su regulación es semejante a la IGF-I. Su principal regulador es la GH. También el estado nutricional juega un papel importante en la regulación de sus niveles, así como el funcionalismo hepático. La edad ejerce una influencia similar a la encontrada en la IGF-I, aunque de una manera algo más atenuada (475-477).

ALS

La ALS es uno de los tres componentes del complejo ternario de 150 kDa, principal transportador de los IGFs en el plasma, indispensable para la estabilidad de dicho complejo. Esta proteína fue identificada por Baxter y se denominó ácido lábil ya que al tratar el suero con pH ácido perdía su capacidad de unión al complejo IGF+IGFBP-3 aunque su estructura y peso molecular permanecía intacta. En sentido estricto no es una proteína transportadora propiamente ya que ella sola no es capaz de unirse con los IGFs a no ser que el IGF este unido previamente a la IGFBP-3 formando un complejo

- DISCUSION -

binario. Parece incrementar la capacidad de unión de la IGFBP-3 por el IGF-I. Su síntesis es casi exclusiva hepática. Tiene un peso molecular de 63.3 kDa. Aproximadamente el 50% de la ALS circula unida al complejo IGF-IGFBP-3 y el resto lo hace en forma libre. Igualmente a IGF-I e IGFBP-3 su factor regulador principal es la GH, ya que esta es capaz de incrementar la síntesis hepática y sus niveles circulantes. Su relación con la edad es semejante al de IGF-I e IGFBP-3. El estado nutricional también regula los niveles de ALS de una manera semejante a la IGFBP-3 ya que existe una disminución de sus niveles en la malnutrición y en los estados catabólicos (478-480).

El complejo ternario de 150 kDa, de alta afinidad transporta la mayor parte de IGF-I, los tres componentes son GH dependientes y se forma secuencialmente ya que primero se debe unir la IGFBP-3 con el IGF-I, formando un complejo binario, y luego la ALS. Este complejo prolonga la vida media de los IGFs que en su forma libre es de varios minutos y en este complejo es de casi 15-17 horas. Sería pues la forma principal en la que los IGFs van vehiculizados en sangre constituyendo un reservorio circulante que evitaría el paso de IGFs hacia sus tejidos evitando que las concentraciones tan elevadas que existen en plasma tengan efectos metabólicos tipo insulina y puedan causar hipoglucemias. Sería un complejo buffer o tampón o almacén de los IGFs. La existencia de este reservorio de IGFs a nivel vascular en su unión con las IGFBPs es importante fisiológicamente ya que no existe ningún almacén tisular ni intracelular de IGFs sino que se secretan conforme se van sintetizando (470).

Mandel (481) analizando los cambios de IGF-I, IGFBP-3, la proteína de unión a la GH (GHBP), receptores eritrocitarios de IGF-I, y la tasa de crecimiento durante la prepubertad en niños con déficit de GH (GHD) durante el tratamiento con GH, que los factores que más se correlacionan con el crecimiento son las concentraciones de IGF-I e IGFBP-3. IGFBP-3 actúa de forma sinérgica con IGF-I en la estimulación del crecimiento en pacientes con GHD, de igual manera que en niños normales.

En nuestros pacientes con EG tipo I hemos demostrado que, tanto IGF-I total como IGFBP-3 son los parámetros que mejor se correlacionan con la talla del niño antes de iniciarse el TES ($r=0.84$ y 0.78 , respectivamente). Cuando la talla del niño se ve más afectada, tanto IGF-I como IGFBP-3 se encuentran más reducidos. Además IGF-I total

- DISCUSION -

muestra una correlación negativa significativa con el índice de gravedad de Zimran SSIA ($r=-0.62$). Tanto IGF-I como IGFBP-3 se correlacionan de forma negativa con la presencia de la mutación L444P ($r=-0.53$ y -0.5 , respectivamente). Como se ha señalado la presencia de esta mutación se ha relacionado con una mayor gravedad en la EG tipo I (36). En este estudio hemos demostrado que el sistema IGF se ve afectado antes de iniciarse el TES y esto. Esto podría ser consecuencia de la afectación hepática que afectaría a la síntesis proteica y por lo tanto a la síntesis de los IGFs; en nuestra población hemos encontrado una correlación negativa significativa entre los niveles de IGF-I libre y los niveles de AST antes de iniciarse el tratamiento ($r=-0.53$); lo que podría apoyar esta hipótesis. Estos niveles disminuidos de IGFs podrían representar un estado de insensibilidad a la GH como se ha encontrado en otras enfermedades crónicas con afectación hepática (482).

La principal consecuencia del déficit de IGFs en la infancia es el retraso de crecimiento. Sin embargo descubrimientos recientes han demostrado que los IGFs tienen efectos anabólicos incluso en adultos. Estas proteínas estimulan la síntesis proteica a nivel de todo el organismo. Los niveles reducidos de IGF-I se han asociado con disminución de la masa muscular y fuerza (462). En adultos con GHD se ha demostrado que los incrementos en IGF-I se relacionan con cambios en la composición corporal (483). Incluso podría estar relacionado con cambios en el perfil lipídico, algo que hemos constatado en los pacientes con EG. Por otro lado se conoce que los niveles disminuidos de IGFs, fundamentalmente IGF-I se relacionan con la osteoporosis, trastorno frecuente entre los pacientes adultos con EG (484). Bengtsson (483) demostró que la calidad de vida, determinada mediante cuestionarios específicos, mejoraba tras 6 meses de terapia con GH en estos pacientes. Estos resultados cabría esperarlos de igual manera en los pacientes con EG tipo I, ya que ellos presentan un déficit de IGF-I como consecuencia de la afectación hepática.

Otro posible origen del pobre crecimiento que experimentan un porcentaje elevado de niños con EG podría ser la expresión disminuida de genes implicados en el crecimiento. Si bien los datos que hemos presentado hacen referencia a sólo dos pacientes adultos y por ello no se pueden extraer conclusiones, sí que resulta llamativo la existencia de genes reprimidos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. Concretamente en relación al sistema IGF hemos encontrado que los genes del IGF-2 y

- DISCUSION -

de las proteínas transportadoras IGFBP-2 e IGFBP-4 se encuentran sensiblemente reprimidos en relación a los controles. IGF-2 es un péptido de 67 aminoácidos, peso molecular de 7471 daltons que consta de una única cadena. El gen se localiza a nivel del cromosoma 11 p14.1. Presenta una homología del 65% con el IGF-1 y del 41% con los dominios A y B de la insulina. Su síntesis es fundamentalmente hepática, aunque se secreta en prácticamente todos los tejidos, ejerciendo su acción sobre múltiples tipos celulares (466). El receptor más específico del IGF-2 es el tipo 2. Se trata de un péptido de cadena única de 270 kDa, a diferencia del 1 carece de homología con el receptor de la insulina. Este receptor es una proteína glicosilada transmembrana con un dominio extracelular que abarca el 75% del receptor, un dominio hidrofóbico transmembrana y una pequeña parte intracelular. Se une fundamentalmente a la IGF-II, menos al IGF-I y prácticamente nada a la insulina. Su gen se sitúa en el cromosoma 19 (468,469).

La expresión de IGF-II se encuentra en casi todos los tejidos y se detecta precozmente en tejidos fetales. Sin embargo y aunque su afinidad sea mucho menor que la de IGF-I, la mayoría de las acciones conocidas de IGF-II se deben a su unión con el receptor tipo 1. Hoy en día se ha demostrado que el IGF-II estimula la migración celular de las células trofoblásticas extravelositarias, aquellas que invaden la decidua uterina y constituyen el nexo de unión entre placenta y útero, y lo hace a través de su acción sobre los receptores de tipo 2, mediante un mecanismo que afecta a proteínas G inhibitorias y activación de la ruta de proteinkinasa mediante fosforilación (468,469).

Al igual que la IGF-I ejerce dos tipos de acciones: unas a corto plazo, de tipo anabólico, sobre el metabolismo proteico y de los carbohidratos, y otras a largo plazo, sobre el crecimiento y la diferenciación celular. Estimula la proliferación celular al estimular la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Al igual que ocurre con IGF-1 parece ser que la célula debe haber entrado en la fase G1 de síntesis proteica, aumentando entonces la síntesis de receptores y de esta manera ser las células capaces de responder a los factores de progresión celular como los IGFs y entrar en la fase S de replicación del DNA y posteriormente en la fase M de mitosis. Este modelo de acción se ha comprobado a nivel de fibroblastos y células de origen mesodérmico (461-469). A diferencia de la IGF-1 sus acciones son menos conocidas, desempeña un papel importante en el crecimiento fetal, pero bastante desconocida en el postnatal. Parece ser que juega un papel importante en la regulación del crecimiento y diferenciación celular,

- DISCUSION -

especialmente a nivel del tejido óseo en donde los osteoblastos son capaces de producir grandes cantidades de IGF-II (470). Durante la organogénesis se detectan grandes cantidades de IGF-II y en estudios recientes se han detectado también un incremento medido en líquido amniótico de macromoléculas precursoras de IGF-II que pudieran tener también un papel importante en el desarrollo fetal (485). Se ha demostrado la capacidad de IGF-II al igual que IGF-I para estimular la diferenciación celular de los mioblastos, osteoclastos, condroblastos, osteoblastos, adipositos y células neurales (469,486). En cuanto a su regulación es menos conocida que la de IGF-I, es menos dependiente de GH y refleja más los niveles circulantes de IGFBP-3. Sus niveles aumentan rápidamente tras el nacimiento durante las primeras semanas para luego permanecer estables y no ser edad dependientes como los de IGF-1 (470,486). Por efecto del lactógeno placentario parece aumentar sus niveles durante la gestación. La malnutrición es otro factor regulador muy importante como ocurre con IGF-I. Lógicamente al ser su síntesis fundamentalmente hepática, en situaciones de enfermedad hepática se pueden ver afectados los niveles de IGF-II como los de IGF-I y guardar correlación con los marcadores de función hepática. En el déficit de GH existe también niveles disminuidos de IGF-II, y la asociación de esta determinación con IGF-I mejora su valor como parámetro diagnóstico. En los síndromes de insensibilidad a la GH existe también una síntesis marcadamente disminuida de IGF-II, al igual que de IGF-I y IGFBP-3 y ALS (470,486).

IGFBP-2 es la segunda IGFBP por su concentración en suero. Es la más abundante en el feto y recién nacido. Sus niveles son altos al nacimiento, disminuyendo con la edad, aunque aumentan algo con la edad adulta. Tiene una relación inversa con la GH y está regulada sobre todo por IGF-II, a la que se une con mayor afinidad. In vitro, tiene un papel inhibitorio sobre la acción de IGF-II en relación con los proceso de diferenciación celular. Se han encontrado niveles aumentados en pacientes con tumores como tumor de Wilms. Existen estudios que han demostrado la acción tanto potenciadora como inhibitoria de los efectos mediados por los IGFs. Concretamente se ha comunicado recientemente su utilidad combinada con IGF-1 e IGFBP-3 en el diagnóstico de GHD (487).

IGFBP-4 se sintetiza en hígado, cerebro, hueso. La secreción ósea está regulada fundamentalmente por el efecto estimulador de la PTH y vitamina D₃, por lo que se

- DISCUSSION -

piensa que puede actuar como mediador del efecto inhibitorio de la formación ósea de ambas hormonas, posiblemente a través de la inhibición del efecto del IGF-I sobre la actividad osteoblástica. Si bien es suficientemente conocido su efecto in vivo sobre la inhibición de los efectos de los IGFs, se ha demostrado que su administración en animales de experimentación incrementa los parámetros de formación ósea (fosfatasa alcalina, osteocalcina) así como de IGF-1 posiblemente por aumento de la biodisponibilidad de IGF a través de mecanismos de proteólisis de la propia IGFBP-4 (488).

Sus niveles no se modifican en función del sexo o edad, pero se ha encontrado una correlación moderada con los de IGF-II. Se ha encontrado una correlación importante con los niveles de PTH en aquellos pacientes con insuficiencia renal hemodializados (489).

Esta alteración en la expresión de estos componente del sistema IGF podría ser un factor más en la génesis del retraso de crecimiento de estos pacientes si bien hay que tener en cuenta por un lado que nuestros resultados proceden de dos únicos pacientes y en segundo lugar no está suficientemente aclarado el papel de estos factores en el crecimiento postnatal a diferencia de lo que ocurre con IGF-I, IGFBP-3 y ALS.

Otras proteínas relacionadas con el crecimiento y diferenciación celular presentan en los dos pacientes una expresión reprimida:

ORP150: proteína de 150 Kda de la familia de las chaperonas, inducible por oxígeno y con origen en el retículo endoplásmico. Su sobreexpresión produce una liberación por el retículo endoplásmico de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) pudiendo tener un papel importante en los procesos de cicatrización. Parece tener un papel crítico en la angiogénesis tumoral a través del procesamiento del VEGF (490,491).

Citocromo P (1)450: Tanto su proceso de transcripción, así como su inducción parecen estar mediados por agentes químicos exógenos (tetraclorodibenzo-p-dioxina y 3-metilcolantreno). Estos procesos de inducción son dependientes de la interacción entre el agente químico y el receptor hidrocarbonado aromático. Sin embargo se ha encontrado su expresión aumentada en embriones de ratones hasta en 7 veces, en

- DISCUSSION -

ausencia del estímulo químico. Estos datos sugieren que el gen del Citocromo p450 (1) puede tener un papel importante durante la diferenciación celular (492).

Glicina N-metiltransferasa: Su gen codifica una proteína que interviene en la regulación de la relación S-adenosilmetionina a S-adenosilhomocisteina y participa en las rutas de detoxificación de las células hepáticas. Contiene 6 exones en cromosoma 6p12 y su expresión se encuentra en hígado, páncreas y próstata. Se sabe que es tanto una proteína de unión de hidrocarburos policíclicos y mediador de la inducción del gen del Citocromo P450(1) por hidrocarburos policíclicos como el benzopireno. Su secreción parece estar regulada por la GH en ratas, de hecho el tto. con GH disminuye su expresión. Además se conoce su papel destacado en la gluconeogénesis (493,494,495).

Gp-39 del cartílago humano (YKL-40): Esta proteína juega un papel en la migración celular y remodelación tisular en la aterogénesis. Es una glicoproteína de la familia de quitinasas. Su función es desconocida si bien estudios inmunocitoquímicos han demostrado una mayor presencia de la proteína en fases de división celular, además aumenta la síntesis de proteoglicanos en condrocitos. Posiblemente estas propiedades como factor de crecimiento explican la remodelación tisular aumentada asociada con niveles elevados de esta proteína en enfermedades articulares (AR) y enfermedades inflamatorias (496,497,498).

PZP: Proteína zona del embarazo. “pregnancy zone protein”. Proteína plasmática asociada con la gestación, con gran similitud con la alfa-2-macroglobulina. Es una proteína de unión y tiene afinidad tanto por el factor de crecimiento beta-1 y 2 (sobre todo con el 2). Sus niveles durante el embarazo deben jugar un papel importante en la distribución, aclaramiento y disponibilidad de TGF-beta. Además se ha visto la existencia de niveles aumentados en individuos con GHD y como el tratamiento con GH disminuye sus niveles al contrario de la acción de los estrógenos sobre esta proteína (499,500).

BZAP45: proteína leucine-zipper. Esta proteína de 45 kDa que contiene un decapeptido que es lugar de unión para un nucleótido (GTP o ATP). Parece ser un factor regulador que contribuye al control transcripcional en la fase de transición G1/S del ciclo celular (501).

Gen GRO: Miembro de una superfamilia de genes que codifican citocinas con propiedades tanto inflamatorias como de regulación de crecimiento (factor plaquetario 4, péptido activador de neutrófilos 1, interleukina 8, proteína plaquetaria básica, betatromboglobulina, proteína inflamatoria del macrófago 2,...) (502).

Posiblemente la menor expresión de estos factores implicados en la diferenciación celular podría condicionar una alteración en el crecimiento del individuo.

1.2.2 Otras manifestaciones

Si bien se ha querido resaltar el retraso de crecimiento y sus causas como motivo principal del estudio, también se ha considerado interesante comentar otras manifestaciones clínicas y analíticas comunes con los pacientes adultos y de esta manera determinar sus peculiaridades en la población infantil.

Enfermedad visceral

Tal y como ocurre en el adulto las visceromegalias son una constante en nuestra población, hasta el punto que un porcentaje elevado de niños la sospecha clínica se basa inicialmente en la existencia de esplenomegalia asintomática, en ocasiones acompañada de retraso de crecimiento. Prácticamente la totalidad de casos de nuestra muestra presentan esplenomegalia en el momento del diagnóstico (95.2%), obedeciendo los dos casos en los que no existía a formas neuronopáticas. En el Registro Internacional se recoge que un 87% de los pacientes no esplenectomizados presentaban un volumen esplénico de al menos 5 veces el normal (141). Sin embargo existen grandes variaciones en lo que se refiere al tamaño esplénico, desde casos en los que se palpa justo por debajo de reborde costal y a otros que presentan importante distensión abdominal y el bazo alcanza la pelvis.

En los pacientes pediátricos el aumento del tamaño esplénico se ha relacionado con retraso de crecimiento (195). Concretamente en nuestra población como se ha señalado hemos encontrado una correlación significativa de -0.51 ($p < 0.05$) entre el tamaño esplénico y la talla antes de iniciarse el TES.

- DISCUSION -

En los pacientes que no han recibido TES, la progresión de la enfermedad esplénica es generalmente lenta, durante años, aunque posiblemente alcanza un punto crítico cuando el paciente presenta anemia que precisa transfusiones. Alcanzado ese punto un círculo vicioso de hiperesplenismo tiene lugar: las transfusiones de concentrados de hematíes se acompañan de marcados incrementos del tamaño esplénico como consecuencia del secuestro y destrucción de los hematíes donantes. En ese caso la instauración rápida del TES o la esplenectomía se hacen necesarios (179).

En la época previa al TES el porcentaje de pacientes que precisaban esplenectomía era más elevado al ser la única alternativa terapéutica en un gran número de situaciones; sin embargo hoy en día ese porcentaje ha disminuido considerablemente. En nuestra muestra solamente un 16% de los pacientes están esplenectomizados, correspondiendo en la mayoría de los casos a pacientes que fueron esplenectomizados en los años anteriores al TES. Desde que se dispone del TES, la esplenectomía no debe considerarse como una primera opción; su uso debe quedar restringido a situaciones infrecuentes en que el TES resulta ineficaz como puede ser la existencia de un descenso plaquetario persistente inferior a 40000, dolor abdominal secundario a infarto esplénico que no remite, retraso de crecimiento y compromiso cardiopulmonar sin respuesta al TES (245). En nuestra cohorte hemos estudiado las diferencias clínicas y analíticas existentes antes de iniciarse el TES entre los pacientes que previamente habían sido esplenectomizados y los que tenían un bazo intacto. Si bien la muestra del primer grupo es reducida (n=8) hemos encontrado una más frecuente afectación ósea entre aquellos esplenectomizados (75% vs 30.9%; $p=0.034$), unos niveles de ALT significativamente mayores y un tamaño hepático que aunque no era significativo como consecuencia de tratarse de una muestra reducida, si que evidencia una tendencia a un mayor volumen entre los esplenectomizados. Se cree que eliminando el principal reservorio de glucolípidos se aceleraría el depósito en otros órganos como la médula ósea y el hígado, y en las formas tipo 3 en el sistema nervioso central. En este sentido existen resultados contradictorios en las distintas series en las que se ha estudiado el efecto de la esplenectomía (245,384). Otro hecho constatado en nuestra cohorte es una mayor frecuencia de la mutación L444P entre aquellos pacientes con EG tipo I que habían sido esplenectomizados (75% vs 35.7%) siendo esta diferencia significativa ($p=0.053$).

La hepatomegalia estuvo presente en el 89.5% de los pacientes estudiados y como hemos señalado era mayor entre aquellos previamente esplenectomizados si bien las diferencias no eran estadísticamente significativas. Según datos del Registro Internacional este hecho es una constante siendo el volumen hepático significativamente mayor en el grupo de pacientes esplenectomizados (141). Si bien la afectación hepática es una constante en la mayoría de los casos, son infrecuentes las complicaciones clínicas significativas presentándose en menos del 5% de los pacientes afectos. Sólo un 50% de los pacientes con hepatomegalia presentan alteraciones del funcionalismo (196). En nuestra cohorte sólo se han detectados discretas elevaciones de las transaminasas hasta en un 50% de los casos.

Enfermedad ósea

Es un hecho relevante que hasta un 54% de los pacientes de nuestra cohorte a pesar de su corta edad presenten enfermedad ósea. En la mayoría de los casos obedece a hallazgos casuales radiológicos como es la presencia de la típica imagen en matraz de Erlenmeyer en la región distal del fémur. Sin embargo hasta un 26% han presentado en su evolución complicaciones mayores (fracturas, infartos, necrosis,...). Las crisis óseas o episodios de dolor agudo las presentan aproximadamente 1 de cada 3 pacientes pediátricos. Como se ha señalado la presencia de esplenectomía predispone a la existencia de enfermedad ósea. La existencia de enfermedad ósea y fundamentalmente las lesiones óseas graves determinan junto con la esplenectomía el peor pronóstico en la EG tipo I de inicio en la edad pediátrica como se constata al analizar el score de gravedad de Zimran.

Enfermedad pulmonar

La afectación pulmonar que cada vez se describe con mayor frecuencia en la EG es excepcional y solamente un individuo de nuestra población presenta signos ecocardiográficos sugestivos de hipertensión pulmonar.

Citopenias

Desde un punto de vista hematológico las citopenias leves y moderadas son una constante en nuestra población, alcanzando prácticamente a la mitad de los pacientes estudiados, ya que en torno a un 45% presentan niveles de hemoglobina inferiores a 11 g/dL y recuentos plaquetarios inferiores a $100 \times 10^9/L$. En el Registro Internacional

- DISCUSION -

encontramos que entre los pacientes con bazo intacto el recuento plaquetario medio es de $85 \times 10^9/L$. Un 26% presentan recuentos plaquetarios inferiores a $60 \times 10^9/L$. En los pacientes esplenectomizados el recuento medio era de $219 \times 10^9/L$ y sólo un 3% presentaban recuentos inferiores a $60 \times 10^9/L$ (141). En nuestra cohorte hemos encontrado una respuesta más llamativa en el recuento plaquetario de aquellos individuos esplenectomizados, ya que su recuento medio era de $196.6 \pm 130.7 \times 10^9/L$. Sin embargo con la evolución de la enfermedad estos pacientes sometidos a esplenectomía pueden volver a presentar este trastorno como consecuencia del fallo de médula ósea como se ha comentado.

Según datos del Registro Internacional la gravedad de la anemia se asocia a la presencia de bazo. Entre los pacientes con bazo intacto la hemoglobina media era de 11.2 g/dL, un 69% presentaban hemoglobinas inferiores a 12 g/dL y un 25% inferiores a 10 g/dL. En el grupo de pacientes esplenectomizados la hemoglobina media era de 12 g/dL, un 54% presentaban hemoglobinas inferiores a 12 g/dL y sólo un 10% inferiores a 10 g/dL. (141). Sin embargo en nuestra población pediátrica los pacientes esplenectomizados presentaban niveles de hemoglobina inferiores a los no esplenectomizados antes de iniciarse el TES (10.2 ± 1.6 vs 11.4 ± 1.7 g/dL) si bien las diferencias no son significativas desde un punto de vista estadístico ($p=0.110$).

Perfil lipídico

La EG tipo 1 se ha asociado con un descenso en la concentración plasmática de colesterol total y HDL colesterol (HDL-C) así como de las apolipoproteínas A-I y B (302). Los pacientes pediátricos también presentan una reducción llamativa de los niveles de colesterol, siendo estos significativamente menores que los que presentan sus familiares sanos, tanto portadores como no portadores. Los niveles disminuidos de colesterol total son a expensas fundamentalmente de su fracción HDL que es en la población estudiada de 25.8 ± 7.8 mg/dL por término medio, significativamente menor que en familiares sanos, portadores y no portadores. Un 84.2% de los pacientes pediátricos presentan niveles inferiores a 35 mg/dL. Las concentraciones de HDL-C en los pacientes pediátricos se encuentran en el rango de la hipoalfalipoproteinemia familiar; la cual está identificada como factor de riesgo de enfermedad coronaria (304). A pesar de tener disminuido el colesterol total, la concentración disminuida de la

fracción HDL-C hace que su índice aterogénico Colesterol total/HDL-C se encuentre elevado.

Otro hallazgo reciente es el hecho de que los individuos portadores de una mutación del gen de la glucocerebrosidasa y por tanto asintomáticos para la enfermedad presentan niveles disminuidos de la fracción HDL-C. En nuestro estudio del perfil lipídico se incluyeron 42 familiares de pacientes de la cohorte entre los que se comprobó que no existían diferencias en los niveles de colesterol total pero si de HDL colesterol (41.2 ± 5.2 vs 51.9 ± 11.4 ; $p=0.000$) y por consiguiente de su IA (4.3 ± 0.9 vs 3.5 ± 1 ; $p=0.020$). Este hecho supone que teniendo en cuenta la frecuencia variable de portadores en diferentes poblaciones (1-7%) (34,35,307,308), las mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa podrían originar hipoalfalipoproteinemia familiar al 2% de la población general convirtiéndose en una de las causas genéticas más importantes del déficit de HDL-C (309).

Marcadores de actividad

Clásicamente se ha utilizado como marcador de actividad de la enfermedad la fosfatasa ácida tartrato resistente, de hecho puede apoyar el diagnóstico de EG, sin embargo esta anomalía no es exclusiva de esta enfermedad. En nuestra población la práctica totalidad de los pacientes estudiados presentan niveles plasmáticos elevados antes de iniciarse el TES.

En la interpretación de los niveles plasmáticos de fosfatasa ácida plasmática hay que tener en cuenta que son edad dependiente y por tanto los niveles están más elevados en los niños (334), sin embargo este hecho no ha sido confirmada en nuestra población pediátrica en la que no hemos encontrado ninguna correlación entre la edad de los pacientes y los niveles de fosfatasa ácida. El hecho de que la fosfatasa ácida tartrato resistente se sintetice en los osteoclastos ha hecho pensar a algunos autores que los niveles plasmáticos se correlacionarían específicamente con la extensión de la enfermedad ósea (299), sin embargo este hecho tampoco ha sido demostrado en nuestros pacientes al no encontrarse ningún tipo de correlación entre la existencia de enfermedad ósea y los niveles de fosfatasa ácida. También se ha comunicado por algunos autores que la esplenectomía provoca una marcada reducción de los niveles de fosfatasa ácida (299), sin embargo en nuestra población no existen diferencias

- DISCUSION -

significativas en los niveles de fosfatasa ácida entre aquellos individuos esplenectomizados y no esplenectomizados.

En los últimos años la actividad de QT ha desplazado a otros marcadores de actividad de la enfermedad. Como se ha señalado la actividad de QT puede encontrarse elevada en enfermedades donde exista una activación del macrófago; pero en ningún caso se alcanza la actividad encontrada en pacientes con EG. Hollak (340) encontró actividad aumentada en más de 600 veces los valores medios en individuos control. Los pacientes de nuestra serie muestran una actividad media de quitotriosidasa muy elevada (20446 ± 13989 nM/mL.h).

Recientemente se ha demostrado la existencia de déficit de QT, que en diferentes poblaciones como la holandesa se sitúa en el 6% de la población general como consecuencia de la existencia de una duplicación de 24 pares de bases en el exón 10 que activa una región de splicing críptica 3' en el mismo exón, lo que origina la formación de un RNAm con una delección de 87 nucleótidos. Todos los individuos deficientes en QT son homocigotos para la duplicación de 24 pares de bases. Basado en la incidencia de déficit de QT se establece que aproximadamente el 37% de la población general es portadora de la duplicación en el gen de la QT (343) y por consiguiente pueden existir diferencias ostensibles en la actividad de QT entre pacientes no debidas a la EG sino al propio déficit de algunos pacientes. Por este motivo en 31 individuos se realizó análisis genético del gen de la QT, encontrándose la duplicación responsable del déficit de QT en 17 individuos (54.8%); porcentaje incluso mayor del esperado. Sin embargo ninguno de los pacientes estudiados tenía un déficit completo de QT (presencia de la duplicación en homocigosis). Al comparar la actividad de estos dos grupos se comprobó que aquellos portadores en heterocigosis de dicho defecto tenían una actividad reducida en relación a los individuos con ambos genes intactos (11561 ± 8829 vs 30830 ± 12826 nM/mL.h; $p < 0.001$).

Al analizar la posible asociación de la actividad de QT con otras variables de la enfermedad se comprobó que dicha actividad se correlaciona principalmente con el tamaño esplénico; hecho que fue confirmado tanto en el grupo total de pacientes como en los dos subgrupos establecidos al estudiar el gen de la QT. Igualmente la existencia de esplenectomía previa se asociaba a actividad más elevada.

Por otro lado hemos comprobado como la actividad de QT antes de iniciarse el TES es un marcador de gravedad en la población pediátrica afecta de EG al existir una correlación positiva moderada que oscilaba entre 0.43 y 0.66 en los distintos grupos establecidos con los índices de gravedad de Zimran; tanto el SSI como el SSIA.

En relación a otras variables las correlaciones encontradas en el grupo total de individuos antes de tener en cuenta la posible existencia de la duplicación en el gen de la QT, deben tomarse con cautela ya que en la mayoría de los casos no se confirmaban por igual en los dos subgrupos establecidos. Este es el caso de la existencia de afectación ósea, donde existe una correlación positiva significativa de 0.41 con la actividad de QT, que no se confirma posteriormente en los dos subgrupos resultado de separar a los pacientes en función de la presencia del déficit de QT.

Índices de gravedad

En relación a la gravedad de la enfermedad se ha utilizado los índices clásico de Zimran; quizás dada las características de esta población es el SSIA, el índice ajustado por edad el más apropiado. El SSIA medio en nuestra población era de 12 ± 4.9 ; lo que situaba a esta población en su conjunto dentro de un grado leve - moderado de EG. Un 50% (n=20) de los pacientes con EG tipo I presentaban un score ≤ 10 (grado leve). Un 45% (n=18) presentaban un score entre 11-25 (grado moderado). Finalmente un 5% (n=2) de los pacientes con EG tipo I quedaban clasificados dentro del grado grave al presentar un score ≥ 26 . El antecedente de esplenectomía y la afectación ósea (sobre todo formas graves) condicionaban los score más elevados como se ha señalado previamente.

Sin embargo es un hecho evidente la necesidad de mejorar estos índices de cara a determinar la posible historia natural de la enfermedad de forma más precisa. Por ejemplo la presencia de retraso de crecimiento en las formas no neuropáticas parece asociarse con la gravedad de la enfermedad y sin embargo no está recogido en estos índices (179).

Otro defecto notable de este índice es la valoración de la enfermedad esquelética lo que ha hecho que en los últimos años se ha intentado asociar al SSI la valoración de otros parámetros como puede ser la resonancia magnética; en este sentido en la reunión del EWGGD, Roca (266) propone la utilización de un score combinado SSI-MRI (Resonancia magnética) que ofrece una mayor sensibilidad y especificidad que el clásico SSI para definir el pronóstico sobre todo en referencia a la afectación ósea. En dicho score se añaden criterios objetivos sobre la afectación esquelética teniendo en cuenta los distintos patrones de afectación ósea (normal, infiltración no homogénea reticular, moteada o difusa y infiltración homogénea). En la serie analizada la aplicación del score de Zimran clasifica al 33.33% de los pacientes en los grupos de afectación leve y moderada, mientras que el nuevo score incluye al 88.88% de los pacientes en los grupos de afectación moderada o grave.

Características enzimáticas

En la actualidad el diagnóstico de EG ha quedado simplificado en gran medida por la posibilidad de determinar la actividad de β -glucosidasa ácida en los leucocitos de sangre periférica. La actividad en los leucocitos de los pacientes con EG es únicamente alrededor del 10% de lo normal; de tal manera que el hallazgo de una actividad por debajo del 15% de la media es diagnóstica de enfermedad (366). Como podemos ver en nuestros pacientes en relación a sus familiares no afectados no existe superposición de la actividad del enzima.

En los individuos portadores los leucocitos y los fibroblastos cutáneos cultivados presentan alrededor de la mitad de actividad para la β -glucosidasa ácida, existiendo una considerable superposición (mayor del 20%) entre los rangos de actividad de los sujetos normales y los heterocigotos; esto condiciona un gran número de falsos positivos y negativos en los resultados. De hecho al estudiar a los familiares portadores y no portadores de los pacientes de nuestra cohorte comprobamos como existe un importante solapamiento en su actividad, de manera que si bien se confirmaron las diferencias significativas entre individuos portadores y no portadores, se constató la existencia de niveles de actividad de β -glucosidasa ácida superponible entre los dos grupos. El 11.47% de los individuos portadores presentaban una actividad de β -glucosidasa ácida situada en -1 desviación estándar de los individuos no portadores. Entre estos últimos,

un 27.77% presentaban una actividad de β -glucosidasa ácida en +1 desviación estándar de los individuos portadores.

1.3 Características genéticas

El análisis genético ha permitido identificar en nuestra población hasta un 81% de los alelos a estudio. El primer dato significativo a tener en cuenta es la casi inexistencia del genotipo N370S/N370S en la población pediátrica. Sólo un caso con diagnóstico a los 5 años presenta este genotipo tan frecuente entre la población general. Según datos del Registro Internacional la frecuencia actual de dicho genotipo es de un 23%; si bien es cierto que dicha frecuencia disminuye de forma significativa en población española hasta un 11% (157). Si a esta menor frecuencia añadimos que la EG en aquellos pacientes con este genotipo con frecuencia conlleva un diagnóstico más tardío que con otras mutaciones (34,168,169), se explica la existencia de un único caso en población pediátrica española. Por el contrario el genotipo N370S/L444P es el más prevalente en nuestra población. Dicho genotipo representa únicamente un 17% en el Registro Internacional (141), en población española según datos del REEG la frecuencia se eleva a un 42% (157). En población pediátrica su frecuencia es algo menor, aproximadamente de un 32%. Por último el genotipo L444P/L444P que según datos del Registro Internacional presenta una frecuencia de tan solo un 2.3%, en nuestra población pediátrica española es de un 6%. Las diferencias tan importantes encontradas en nuestra población en relación a la población estudiada en el Registro Internacional se debe no solamente a la edad menor de nuestra cohorte, sino a la fuerte presencia de individuos de origen ashkenazi en el Registro Internacional.

En relación a la frecuencia alélica señalar las diferencias significativas encontradas con otras poblaciones de origen no judío. Así en la serie de Koprova (143) en población no judía la mutación más prevalente era la L444P con una frecuencia de 37.5%, seguida a continuación por la N370S con una frecuencia de 34.3%. Sin embargo en nuestra población sin alcanzar la alta prevalencia de la N370S en población de origen ashkenazi (hasta un 77%), es esta mutación la más prevalente con una frecuencia del 41% frente al 24% de la L444P. Estos datos son semejantes a los presentados en el REEG donde la frecuencia de la mutación N370S es de un 46.3% y de la L444P un 18.5% (157). Las deleciones y recombinaciones representan en conjunto un 4% en nuestra población; una frecuencia reducida en relación a la alta prevalencia encontrada para este tipo de alteraciones genéticas en población no judía (143) y que nos aproximaría más a la

- DISCUSION -

población ashkenazi donde estas alteraciones son prácticamente inexistentes. El cuarto lugar en frecuencia lo ocupa al igual que en el REEG (157) la mutación G377S con un 3%.

En nuestra población se han encontrado 3 mutaciones descritas hasta la fecha únicamente en pacientes españoles, concretamente G195W, T134P e Y313H.

En los casos clasificados desde un punto de vista clínico como formas neuronopáticas (n=6) se encontraron los siguientes genotipos: Tipo 2 (n=2): L444P/L444P y L444P/desconocida. Tipo 3 (n=4): G377S/G195W, N370S/G195W, L444P/E326K y desconocida/desconocida. Además hay que hacer mención especial a otros 3 casos clasificados atendiendo a aspectos clínicos como EG tipo I que presentan genotipos asociados habitualmente a formas neuronopáticas; dos pacientes homocigotos para la mutación L444P/L444P y otro individuo homocigoto para la D409H/D409H. Se conoce que la homocigosis para la mutación L444P predispone para la existencia de una forma neuronopática de la enfermedad (29). Es más, hoy en día sabemos que probablemente la presencia de esta mutación en homocigosis nos tiene que hacer pensar en una EG tipo 3; ya que para presentar una EG tipo 2 es preciso un alelo con actividad nula (recombinaciones) y que muchos de los casos descritos como EG tipo 2 y homocigotos para la mutación L444P eran realmente falsos homocigotos para dicha mutación (143) y que posiblemente otras mutaciones derivadas del pseudogen puedan estar presentes (187). Incluso en población japonesa donde existían numerosos casos descritos de niños con EG tipo I y homocigosis para la mutación L444P (143,178,179), como ocurre en nuestros dos casos; hoy en día se está demostrando que estos pacientes en su evolución posterior está desarrollando sintomatología neurológica, por lo que debemos hablar de individuos afectados de EG tipo 3 (151). En cuanto al paciente portador del genotipo D409H/D409H hasta la fecha no ha desarrollado la clínica típica que ha hecho que en los últimos años a estos pacientes se les haya clasificados como EG tipo 3c; si bien es cierto que este paciente fue diagnosticado por su afectación visceral antes del año de edad y en la actualidad tiene todavía 5 años, por lo que no se puede descartar que desarrolle la clínica habitual de este genotipo más adelante.

- DISCUSION -

Otro caso significativo es el de una paciente con genotipo N370S/G195W y que ha presentado una epilepsia mioclónica; quedando clasificado por consiguiente atendiendo a criterios clínicos como EG tipo 3. Sin embargo hasta la fecha la mutación N370S parece impedir el desarrollo de clínica neurológica (29). Es difícil suponer que la epilepsia mioclónica en esta paciente sea independiente de la EG y por ello se ha clasificado como tipo 3, sin embargo es llamativo que la epilepsia haya podido ser controlada antes del TES con terapia anticonvulsiva habitual y la paciente precise dosis no excesivamente elevadas del enzima para el control de la enfermedad.

Se ha discutido mucho sobre la correlación genotipo-fenotipo en la EG y hasta ciertos límites se conocen determinadas relaciones. Como se ha comentado previamente la homocigosidad para la mutación L444P predispone para la existencia de una forma neuronopática de la enfermedad (29), más probablemente como se ha señalado una EG tipo 3. La presencia de la mutación N370S parece prevenir el desarrollo de una EG tipo 2 ó 3 (29). Y como cabría esperar la enfermedad es más bien leve en aquellos individuos homocigotos para dicha mutación en relación a aquellos otros que comparten dicha mutación con mutaciones consideradas más graves (N370S/L444P ó N370S/84GG) (36). Está claro que aquellos individuos con genotipos distintos a la homocigosidad para la mutación N370S desarrollaran más probablemente enfermedad ósea, afectación hepática y esplénica más graves y inicio de la sintomatología más precoz (168). De hecho ya hemos comentado que por esa circunstancia sólo hemos detectado un caso con dicho genotipo en población pediátrica.

Sin embargo es obvio que existen diferencias en la expresión clínica de los diferentes genotipos, con importantes variaciones intragrupo. Se han comunicado pacientes afectados de la mutación N370S en homocigosis manifestando EG tipo I moderadamente severa mientras que algunos pacientes con los genotipos N370S/84GG y N370S/L444P presentan formas leves (142,168,169). No existen suficiente información para asegurar cuanto de estas variaciones son interfamiliares, intrafamiliares, y cuanto puede deberse a factores ambientales (29).

La no existencia de casos homocigotos para la mutación N370S/N370S nos ha impedido estudiar en nuestra población la diferencias clínicas entre este genotipo y los demás. Sin embargo y dada la elevada frecuencia de casos portadores de la mutación

- DISCUSION -

L444P hemos analizado la posible influencia en las manifestaciones de la enfermedad de esta mutación a la que se le supone un peor pronóstico. No se encontró ninguna asociación significativa con las variables habitualmente analizadas en la EG a excepción de la mayor frecuencia de dicha mutación entre los individuos esplenectomizados (75% vs 35.7%; $p=0.053$). Sin embargo y como se ya se ha señalado si parece existir una asociación significativa entre la presencia de dicha mutación en la EG tipo I y las alteraciones en el crecimiento que estos pacientes presentan. De hecho se ha constatado en nuestra población una correlación negativa aunque moderada ($r=-0.43$; significativa para una cola de distribución, $p=0.043$) con la talla de los niños afectados en edad de crecimiento antes de iniciarse el TES y lo que posiblemente tenga más implicaciones que el propio retraso de crecimiento como posteriormente se comentará, la asociación negativa existente entre la presencia de esta mutación y los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina, IGF-1 total y su proteína transportadora IGFBP-3.

Hemos analizado también las características de los tres subgrupos de genotipos en nuestra población (N370S/L444P, N370S/otras y otras / otras). En relación a la edad de diagnóstico no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes portadores de la mutación N370S dependiendo de cual fuera la otra mutación. Sin embargo entre los pacientes pediátricos afectados de EG sin la mutación N370S, la edad al diagnóstico media era de 3.7 años, significativamente menor que entre aquellos portadores de la mutación. Hay que resaltar que entre los niños afectados de EG y no portadores de la mutación N370S (10/50) se encuentran 5 pacientes afectados de formas neuronopáticas y como ya se ha señalado dos casos homocigotos para la mutación L444P y un caso homocigoto para la mutación D409H. Esto en definitiva supone que existe una alta probabilidad de desarrollar una forma neuronopática cuando las manifestaciones de la EG se inician en la infancia en individuos no portadores de la mutación N370S.

Dentro de la EG tipo I cabría encontrar una mayor gravedad en las manifestaciones y peor pronóstico en aquellos portadores de la mutación L444P; sin embargo si bien se ha encontrado una mayor incidencia de esplenectomía y una más frecuente existencia de alteraciones aunque no importantes de la función hepática entre los individuos con genotipo N370S/L444P que aquellos que asocian la mutación N370S a otras mutaciones distintas el score de gravedad de Zimran es semejante para los dos subgrupos.

2. RESPUESTA AL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SUSTITUTIVO

En el año 1993 se inició el TES en la población española afecta con EG. Desde aquella fecha hasta la actualidad 39 pacientes con diagnóstico en la edad pediátrica, lo que representa el 82.9% de los pacientes vivos en la actualidad, se benefician del tratamiento.

Como se ha señalado, inicialmente sólo los enfermos sintomáticos eran tributarios de tratamiento, no contemplándose las indicaciones de carácter profiláctico. Como única excepción a esta regla se admitía el inicio de TES en pacientes asintomáticos con afectación ósea extensa demostrada por cualquier medio (389). Sin embargo incluso en una primera fase donde el inicio del tratamiento se veía muy limitado, se empezaba a considerar la posibilidad, si bien no constituía una indicación absoluta, el tratamiento en niños menores de 5 años aunque la sintomatología fuera leve y niños asintomáticos con hermanos afectados de enfermedad grave. En la actualidad el tratamiento se está extendiendo a todos los pacientes diagnosticados en la infancia al ya que cada vez existe más evidencias de la posible acción preventiva del TES fundamentalmente en el desarrollo de las complicaciones ósea y retraso de crecimiento (245,415).

Por consiguiente parece necesario el inicio del TES de la forma más precoz posible en los pacientes con debut en la infancia. El inicio del TES en la década de los 90 ha hecho que la edad media actual de inicio del tratamiento en los pacientes incluidos en esta serie sea excesivamente tardío, en torno a los 14.6 años, existiendo un 46.1% de pacientes que lo iniciaron con más de 14 años y aunque la respuesta sea favorable en el control de las visceromegalias, citopenias e incluso la enfermedad ósea sino existen todavía complicaciones, no se han visto beneficiados durante el periodo de crecimiento. En la actualidad el retraso de crecimiento aún siendo la única manifestación en los niños afectados con EG constituye por sí solo motivo suficiente para iniciar el tratamiento.

Ya se ha comentado la importante controversia existente desde el inicio del TES en relación al esquema terapéutico a utilizar (390). A pesar de que el esquema terapéutico de dosis bajas / alta frecuencia ha mostrado su eficacia en el control de las manifestaciones habituales de la EG (391,392), cada vez se ha extendido más el uso de dosis altas / baja frecuencia en la infancia; sobre todo en relación a la enfermedad ósea y el retraso de crecimiento. Parece claro (al menos es la actitud de la mayoría de los

- DISCUSION -

autores) que la afectación ósea importante responde de una forma más rápida y eficaz al esquema de dosis más altas y en régimen de administración quincenal (399). En cuanto al retraso de crecimiento que presentan hasta un 50% de los niños con EG se ha visto que la respuesta parece ser más importante en los pacientes tratados con dosis entre 60 y 120 U / kg / mes, si bien existen controversias en este sentido (411). Sin embargo hay que reconocer que en ausencia de estos dos problemas (enfermedad ósea y retraso de crecimiento) el control de las manifestaciones no esqueléticas de la EG tipo 1 la dosis mínima eficaz se puede alcanzar tanto con el esquema de dosis elevadas con una reducción progresiva de la dosis o iniciando con la dosis mínima. La dosis mínima terapéutica puede establecerse aproximadamente en 10-15 U / kg / 2 semanas (401). La totalidad de pacientes que han recibido TES en nuestra cohorte inició tratamiento con dosis altas / baja frecuencia.

Más problemas plantea el tratamiento en las formas neuronopáticas. Hasta la fecha no se ha comunicado ninguna respuesta mínimamente favorable en la EG tipo 2. Ninguno de nuestros dos pacientes afectos de EG tipo 2 ya fallecidos recibieron TES. En el caso de los pacientes con EG tipo 3 en el control de la sintomatología extraneurológica el TES se ha mostrado eficaz como ocurre en los pacientes con EG tipo 1 si bien en la mayoría de las series ha sido preciso la utilización de dosis elevadas (278, 301). En la actualidad el efecto del TES en la progresión de la enfermedad neurológica requiere un seguimiento más extenso. En series recientes (419-421) se ha comprobado como la utilización de dosis elevadas (120 U / kg / 2 semanas o incluso mayores) no solo permite el control de la sintomatología visceral sino que puede estar indicada al ser capaz de detener la progresión y en algún caso mejorar la afectación neurológica de estos pacientes. De nuestros 4 pacientes diagnosticados como EG tipo 3 tenemos datos recogidos sobre la respuesta al TES en 3 casos. Uno de ellos sin afectación visceral no ha presentado mejoría de las manifestaciones neurológicas. En los otros dos casos el TES a la dosis de 60 U/kg/2 semanas ha sido eficaz en el control de las manifestaciones viscerales importantes que presentaban. En uno de ellos como se ha comentado la epilepsia mioclónica fue controlada previamente al inicio del TES y en el segundo caso no existe progresión de la afectación neurológica si bien persiste la sintomatología.

En todos los casos el esquema de tratamiento utilizado ha sido semejante, no sólo en la dosis utilizada sino también en el momento de inicio del descenso de la dosis. En este

- DISCUSION -

sentido es preciso haber alcanzado primero la normalización de los parámetros clínicos y analíticos y mantenerla durante al menos 6 meses. A partir de ese momento se puede reducir la dosis en un 50% cada 6 meses hasta alcanzar una dosis mínima de 15 U / kg / 2 semanas (26). Sin embargo este esquema puede ser discutible en población pediátrica dado que se ha comprobado como la reducción de la dosis en un 50% de forma progresiva se relaciona con una mejoría insuficiente en los niveles de hemoglobina y plaquetas, así como en términos de crecimiento (403). En nuestra población existen casos en los que el intento por llegar a esa dosis mínima ha provocado igualmente un empeoramiento de la enfermedad lo que obligó a incrementar nuevamente la dosis.

La recomendación reciente del grupo de Elstein (404) sobre la posibilidad de retirar el tratamiento y establecer controles clínicos para evaluar el posible reinicio del mismo para aquellos pacientes con normalización clínica durante un periodo de tiempo prolongado en TES, no debe ser considerada en niños debido fundamentalmente a que el retraso de crecimiento es una de las causas mayores de inicio de tratamiento en estos pacientes (245) por lo que es prudente mantener un esquema estable hasta la pubertad aunque exista una reducción significativa en las organomegalias y normalización de los parámetros hematológicos (404).

Como se ha señalado hoy en día en la población pediátrica el retraso de crecimiento sin otra causa aparente es un motivo suficiente para iniciar el TES. Se ha demostrado que el TES puede normalizar el crecimiento si bien no existe todavía suficiente evidencia en la literatura (262). En 15 pacientes de nuestra cohorte se recogió la talla antes de iniciarse el tratamiento y durante su seguimiento. El Z-score de talla pasaba de -1.65 ± 1.3 al inicio del mismo a -1.25 ± 0.96 SDS ($p=0.012$) a los 13 ± 5.6 meses de iniciado el tratamiento. Durante el segundo año de tratamiento sigue existiendo un crecimiento recuperador aunque no tan marcado como durante el primer año.

Cuando analizamos los cambios en el sistema IGF durante el tratamiento, encontramos que el TES provoca un incremento significativo de los niveles de IGF-I libre, IGFBP-3 y ALS total durante el primer año de tratamiento y de IGF-I total durante los dos primeros años. Esto podría explicarse por la normalización de la función hepática, que tiene lugar en la totalidad de nuestros pacientes, que corregiría el estado de insensibilidad a la GH en los primeros años de tratamiento. Existe una elevación

- DISCUSION -

significativa de IGF-I total y al mismo tiempo de sus proteínas transportadoras lo que aumentaría la vida media del IGF-I. Todos los componentes del complejo ternario ven incrementados de forma significativa sus niveles plasmáticos. Más estudios son necesarios para clarificar la respuesta en el sistema IGF a más largo plazo.

En relación a las manifestaciones habituales que el paciente pediátrico comparte con el adulto hay que señalar que en la población pediátrica la respuesta al TES es igualmente muy evidente en la reducción de las visceromegalias. Tanto la hepatomegalia como la esplenomegalia experimentan una reducción de aproximadamente el 50%. Se considera una respuesta positiva la reducción del volumen hepático en un 20 – 30% y del volumen esplénico entre un 30 – 50% (26,394). Ambos objetivos se cumplen al año de iniciado el tratamiento en la población pediátrica estudiada. Como se puede observar la respuesta es muy semejante tanto para el tamaño hepático como esplénico. Existe una reducción muy significativa durante el primer año de tratamiento para que a continuación y durante los siguientes 2 años de seguimiento no se produzcan modificaciones significativas. La respuesta inicial es ya manifiesta a los 3 meses tanto en el hígado como en el bazo, siguiendo esa reducción de volumen durante todo el primer año. Diversos autores han comprobado como el grado en que el hígado y bazo disminuyen durante el tratamiento está en relación directa con su volumen previo. Estos autores han encontrado que la respuesta es la misma independientemente de la dosis utilizada en el rango de 30 U / kg / mes y 130 U / kg / mes. Para una dosis de 15 U / kg / mes la respuesta es menor en aquellos pacientes con organomegalias masivas pero igual en aquellos con organomegalias moderadas (397,405-410).

La respuesta hematológica también resulta muy llamativa. Si inicialmente un 45.6% de los pacientes presentan niveles de hemoglobina inferiores a 11 g/dL, al año ese porcentaje se ha reducido hasta un 13.7%. Durante el segundo y tercer año el porcentaje de casos con niveles de hemoglobina reducidos se sitúa entre el 0 y 5.5%. Cuando analizamos la respuesta en aquel subgrupo de pacientes que presentan niveles inferiores a 11 g/dL antes de iniciarse el tratamiento podemos comprobar como la respuesta tiene lugar al igual que ocurría en las visceromegalias durante el primer año; sin que existan posteriormente incrementos significativos. Dentro del primer año la respuesta se da de forma muy precoz, siendo significativo el incremento ya a los 3 meses al pasar la hemoglobina media de 9.7 a 10.8 g/dL. A los 6 meses la hemoglobina media es de 12.3

- DISCUSION -

g/dL. Entre los 6 meses y 12 meses no encontramos variaciones significativas, por lo tanto en lo que a los niveles de hemoglobina se refiere la respuesta es muy rápida y recortada en el tiempo. Se considera una respuesta favorable la existencia de un incremento de la hemoglobina en 1,5 g/dL; hecho constatado a los 6 meses en nuestra cohorte; y la normalización de las cifras en un 30-50% de pacientes; igualmente constatado a los 6 meses de iniciado el tratamiento (26,394).

En cuanto al recuento plaquetario podemos encontrar una respuesta parecida, si bien existe alguna pequeña diferencia. El porcentaje de casos que presentan recuentos plaquetarios inferiores a $100 \times 10^9/L$ se reduce durante el primer año de tratamiento de un 46.8% a un 13.7% a los 12 meses con diferencias estadísticas significativas. Posteriormente y al igual que sucedía con los niveles de hemoglobina no existen modificaciones durante el segundo y tercer año de seguimiento. Cuando analizamos la respuesta en aquel subgrupo de pacientes que presentan recuentos inferiores a $100 \times 10^9/L$ antes de iniciarse el tratamiento podemos comprobar como la respuesta tiene lugar al igual que ocurría con los niveles de hemoglobina durante el primer año; sin que existan posteriormente incrementos significativos. Sin embargo dentro del primer año la respuesta se da una forma no tan más precoz y más mantenida que lo que ocurre con los niveles de hemoglobina, existe un incremento significativo ya a los 3 meses al pasar el recuento medio de 51.5 a $72.7 \times 10^9/L$. Sin embargo el incremento no es significativo a los 6 meses. A los 6 meses cuando ya los niveles de hemoglobina tienden estabilizarse se inicia la respuesta más manifiesta en el recuento plaquetario, pasando dicho recuento a $107.7 \times 10^9/L$. Se considera una respuesta favorable la duplicación de los recuentos en caso de trombocitopenias graves y normalización en las leves (26,394). Si bien existe una respuesta favorable; los recuentos plaquetarios en estos pacientes tienden a estabilizarse en el rango bajo de la normalidad, por termino medio entre 120 – $130 \times 10^9/L$.

No se han presentado datos sobre la respuesta de los parámetros de función hepática dado que tanto las leves alteraciones encontradas en los niveles de AST y ALT se normalizan en la totalidad de pacientes tras iniciarse el tratamiento.

En relación al perfil lipídico habíamos encontrado antes de iniciarse el tratamiento niveles significativamente bajos en relación a sus familiares sanos tanto de colesterol

- DISCUSION -

total y fundamentalmente de la fracción HDL colesterol. Como consecuencia de un mayor descenso en los niveles de HDL colesterol el IA se elevaba de forma significativa en relación a los controles. Pues bien los niveles de colesterol total se incrementan aunque de forma moderada durante el primer año de tratamiento pasando de 123.2 a 136 mg/dL; a partir de ese momento y durante el seguimiento posterior dichos niveles se estabilizan. La fracción HDL colesterol experimenta un incremento espectacular pasando de 21.8 ± 4.2 mg/dL a 33.9 ± 10.3 mg/dL a los 15 ± 7.9 meses ($p=0.003$). Posteriormente durante el segundo año de seguimiento no se objetivan modificaciones significativas. Este incremento mucho mayor de la fracción HDL en relación al experimentado por el colesterol total suponen un descenso significativo en el índice aterogénico de estos pacientes durante el primer año de tratamiento. Sin embargo, a pesar de ser este un hecho ya constatado (305,306) se desconoce las implicaciones que puede tener sobre los pacientes la existencia de un mayor riesgo aterogénico que parece disminuir con el TES.

La evaluación de la respuesta esquelética en la EG al TES resulta complicada y más aun en los pacientes pediátricos. En nuestra población se ha constatado un menor número de episodios de crisis óseas; sin embargo desconocemos el posible efecto preventivo del TES sobre las complicaciones. Como ya se ha señalado anteriormente hoy en día el método de elección para evaluar la respuesta de la médula ósea al tratamiento es la resonancia magnética (412-414); sin embargo su aplicabilidad en los niños es difícil por la distinta composición de la médula ósea a esas edades.

La respuesta del retraso de crecimiento y de aquellos factores peptídicos (IGFs) que juegan un papel crucial en el mismo se discutirá en el último apartado.

La fosfatasa ácida era hasta hace relativamente poco tiempo el marcador de actividad más utilizado en la EG. Como cabría esperar existe un descenso significativo en los niveles de esta enzima durante el tratamiento. Durante el primer año los niveles de fosfatasa ácida experimentan un descenso muy significativo pasando de 27.1 a 10.3 U/L; esta respuesta es ya evidente a los 3 meses de iniciado el tratamiento. Posteriormente durante el segundo y tercer año de seguimiento no existen cambios significativos. En definitiva se puede decir que el TES ha demostrado reducir de forma rápida los niveles de fosfatasa ácida, pero con frecuencia de forma parcial (22), algo que

- DISCUSION -

hemos constatado ya que los niveles de fosfatasa ácida de aquellos pacientes ya asintomáticos tras varios años de tratamiento permanecen elevados en relación a los valores de normalidad.

Como hemos señalado el marcador de actividad que ofrece más información es la actividad de quitotriosidasa. Hemos comprobado como en nuestros pacientes dicha actividad está notablemente elevada antes de iniciarse el tratamiento y como en ese momento se correlaciona de forma significativa con el tamaño esplénico y con la gravedad de la enfermedad determinada mediante el índice de gravedad de Zimran. En relación a la respuesta al TES, si bien se ha comprobado el descenso continuo durante el mismo, la actividad permanece elevada, a pesar de que el paciente se encuentre asintomático. Por ello algunos autores creen que no puede ser considerado un marcador directo de la respuesta al tratamiento (346,347). Sin embargo si se ha visto que la actividad de quitotriosidasa depende de la continuación del TES y se convierte en un marcador muy sensible de cualquier interrupción del mismo.

En nuestra población hemos comprobado la existencia de un descenso rápido y sostenido durante los dos primeros años de tratamiento, es decir una respuesta más prolongada que la encontrada para la fosfatasa ácida y los demás parámetros clínicos y analíticos analizados. El descenso es ya significativo a los 6 meses de iniciado el tratamiento, constatándose un descenso de un 33.3% por término medio; descenso mayor del 15% que se considera como criterio de respuesta favorable al año del tratamiento. Al año el descenso en relación a la actividad basal es ya de un 65.2%, hecho que contrasta con la respuesta comunicada en el tratamiento anti-substrato por el grupo de Cox, donde el descenso si bien cumple el criterio anterior de respuesta favorable, es de sólo un 16%. Por otro lado dicho tratamiento no ha sido utilizado hasta la fecha en pacientes pediátricos. Como se ha señalado, sigue existiendo respuesta a los dos años de tratamiento, con un descenso significativo de un 31.6% en relación a la actividad del enzima al año de tratamiento. Posteriormente y como ya se ha comunicado en la literatura, a pesar de estar el paciente estable y asintomático en muchos casos la actividad de quitotriosidasa permanece elevada en relación a individuos no afectados de EG. Durante el tercer año de tratamiento no hay variaciones significativas. En el cuarto año de tratamiento un subgrupo de ocho pacientes experimentan un nuevo descenso

- DISCUSION -

significativo en un 23% en relación al control anterior posiblemente motivado a la necesidad en los meses previos de incrementar nuevamente la dosis del TES.

Al mismo tiempo hemos comprobado como las modificaciones en la actividad de quitotriosidasa son dependientes de forma exclusiva en estos pacientes del TES, ya que al analizar los cambios de actividad en ocho pacientes durante un año antes de iniciar el tratamiento no se han objetivado cambios significativos.

En resumen señalar que el TES permite un control rápido de las manifestaciones habituales de la enfermedad en la población pediátrica a lo largo del primer año de tratamiento de forma análoga a lo que ya se conoce en individuos adultos. Además hemos comprobado que normaliza el patrón de crecimiento en aquellos niños que presentaban retraso de crecimiento probablemente por la recuperación que experimenta el sistema IGF.

CONCLUSIONES

- CONCLUSIONES -

1. Hasta un 42% de los niños afectos de EG presentan retraso de crecimiento. El TES incrementa de forma significativa la velocidad de crecimiento en esta población.

2. El retraso de crecimiento en los niños con EG se relaciona con las alteraciones en el sistema IGF. La EG tipo I presenta niveles disminuidos de IGF-I total, IGF-I libre e IGFBP-3, pudiendo ser consecuencia de la afectación hepática. El déficit de IGF-I total se asocia con la gravedad de la enfermedad. Los niveles de IGF-I total e IGFBP-3 se correlacionan de forma manifiesta con la talla de los niños antes de iniciarse el tratamiento. Finalmente el TES provoca un incremento significativo en los niveles de IGF-I libre e IGFBP-3 durante el primer año y de IGF-I total durante los dos primeros años de tratamiento.

3. Los pacientes con EG de inicio en la edad pediátrica presentan como característica clínica más frecuente la enfermedad visceral seguida de la afectación ósea y neurológica. El grado de gravedad de la enfermedad determinado mediante el SSIA sitúa a esta población en un grado de afectación moderado.

4. Un 72% de los pacientes con EG de inicio en la edad pediátrica presenta algún tipo de citopenia antes de iniciarse el TES con independencia del genotipo de la enfermedad. En la mayoría de los pacientes dichas citopenias son leves – moderadas.

5. La enfermedad de Gaucher con diagnóstico en edad pediátrica que ha precisado esplenectomía conlleva un riesgo aumentado de desarrollo de enfermedad ósea y alteración de las enzimas hepáticas.

6. Los pacientes con EG de inicio en la edad pediátrica presentan niveles plasmáticos disminuidos de colesterol total, fundamentalmente a expensas de los niveles disminuidos de HDL-colesterol. Esta situación de hipoalfalipoproteinemia lleva consigo un aumento del índice aterogénico de estos pacientes. Además la hipoalfalipoproteinemia es una condición presente, aunque en menor medida que en los

- CONCLUSIONES -

individuos afectos de EG, en aquellos individuos portadores de una mutación en el gen de la glucocerebrosidasa.

El TES incrementa los niveles de colesterol total a expensas del incremento de HDL-colesterol, con el consiguiente descenso del índice aterogénico.

7. La actividad de QT se ha mostrado como un importante marcador de actividad de la enfermedad en la población pediátrica afecta de EG, presentando una asociación importante con el tamaño esplénico, así como con el índice de gravedad de Zimran.

8. La distribución de mutaciones en la población española con EG de inicio en la edad pediátrica ha mostrado un predominio de la mutación N370S, presente en cerca de la mitad de los alelos estudiados. Dicha distribución se sitúa entre la propia de la población ashkenazi y el de otras poblaciones de origen no judío. La presencia de la mutación L444P supuso en la era previa al TES una mayor incidencia de esplenectomía en los pacientes con diagnóstico en edad pediátrica. Además esta mutación se asocia a un mayor grado de retraso de crecimiento en la infancia y a un mayor déficit de IGF-I e IGFBP-3.

9. El TES se ha mostrado eficaz en la EG de inicio en la edad pediátrica en la reducción de las visceromegalias y normalización de la hemoglobina y recuento plaquetario, tratándose de una respuesta que tiene lugar durante el primer año de tratamiento. El TES provoca una reducción drástica de la actividad de QT que se evidencia ya a los 6 meses y persiste al menos hasta los 2 años de tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- BIBLIOGRAFIA -

1. Gaucher PCE. De l'épithéliome primitif de la rate. Thèse, 1882. Faculté de Médecine. Paris.
2. Brill EN. Primary splenomegaly with a report of three cases occurring in one family. *Am J Med Sci* 1901; 121: 377-392.
3. Collier WA. A case of enlarge spleen in a child aged six. *Transactions of the Pathological Society of London* 1895; 46:148-150.
4. Kraus EJ. Zur Kenntnis der Splenomegalie Gaucher, insbesondere der Histogenese der Groxxzellen Wucherung. *Zeitschrift für Angerwandt Anatomie* 1920; 7:186-234.
5. Oberling C, Woringer P. La maladie de Gaucher chez le nourrisson *Rev Fran Ped* 1927; 3:475-532.
6. Lieb H. Cerebroside Speicherung bei Splenomegalie (typus Gaucher). *Zeitschrift für Physiologische Chemie* 1924; 140:305-313.
7. Aghion E. La maladie de Gaucher dans l'enfance. Thèse, 1934. Faculté de Médecine. Paris.
8. Brady RO. Gaucher's disease: past, present and future. *Ballière's Clin Haematol* 1997; 10:621-634.
9. Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. Metabolism of glucocerebrosides. II Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Bioch Bioph Res Comm* 1965; 18:221-225.
10. Kampine JP, Brady RO, Kanfer JN. The diagnosis of Gaucher's disease and Niemann-Pick disease using small samples of venous blood. *Science* 1967; 155: 86-88.
11. Beutler E, Kuhl W. The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of a deficiency of beta-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes. *J Lab Clin Med* 1970; 76: 747-755.
12. Barneveld RA, Keijzer W, Tegelaers FPW, Ginns EI, Geurts van Kessel A, Brady RO, et al. Assignment of the gene coding for human β -glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Hum Genet* 1983; 64:227-231.
13. Ginns EI, Choudary PV, Martin BM, Winfield S, Stubblefield B, Mayor J, et al. Isolation of cDNA clones for human β -glucocerebrosidase using the λ gt11 expression system. *Bioch Bioph Res Comm* 1984; 123:574-580.
14. Grabowsky GA. After 200 mutations what is left to know?. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000.
15. Brady RO, Pentchev PG, Gal AE. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1974; 291: 989-993.

16. Kattlove HE, Williams JC, Gaynor E, Spivack M, Bradley RM, Brady RO. Gaucher cells in chronic myelocytic leukemia: an acquired abnormality. *Blood* 1969; 33: 379-390.
17. Stahl PD, Rodman JS, Miller MJ, Schlesinger PH. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:1399-1403.
18. Furbish FS, Steer CJ, Barranger JA, Jones EA, Brady RO. The uptake of native and desialylated glucocerebrosidase by rat hepatocytes and Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 81: 1047-1053.
19. Doebber TW, Wu MS, Burgianesi RL, Pompipom MM, Furbish FS, Barranger JA, et al. Enhanced macrophage uptake of synthetically glycosylated human placental beta-glucocerebrosidase. *J Bio Chem* 1982; 257:2193-2199.
20. Furbish FS, Steer CJ, Krett NL, Barranger JA. Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1981; 673:425-434.
21. Murray GJ. Lectin-specific targeting of lysosomal enzymes to reticuloendothelial cells. *Methods Enzymol* 1987; 149:25-42.
22. Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1464-1470.
23. Beutler E, Kay A, Saven A, Garrar P, Thurston D, Dawson A, et al. Enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood* 1991; 78:1183-1189.
24. Zimran A, Hadas-Halpern S, Zevin S, Levy-Lahad E, Abrahamov A. Low-dose high-frequency enzyme replacement therapy for very young children with severe Gaucher disease. *Br J Haematol* 1993; 85:783-786.
25. Rosenthal DI, Doppelt SH, Mankin HJ, Dambrosia JM, Xavier RJ, McKusick KA, et al. Enzyme replacement therapy for Gaucher disease: skeletal responses to macrophage-targeted glucocerebrosidase. *Pediatrics* 1995; 96(4 Pt 1):629-637.
26. Pérez-Calvo JI. Tratamiento enzimático sustitutivo. En: *Enfermedad de Gaucher*. Giraldo P, Giralto M, Pocovi M, Pérez-Calvo JI (eds). RS editorial. Zaragoza, 1999. Pag 165-179.
27. Barranger JA, Rice EO, Dungan J, Sansieri C, Takiyama N, Beeler M, et al. Gaucher's disease: studies of gene transfer to haematopoietic cells. *Baillière's Clin Haematol* 1997; 4:765-778.
28. Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, Van Weely S, Hrebicek M, et al. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 2000; 355: 1481-85.

29. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher Disease. In: Scriver CR, Beudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*, 7th edn. New York: Mc Graw-Hill, 1995: 2641-2670.
30. Fried K. Population study of chronic Gaucher's disease. *Isr J Med Sci* 1973; 9: 1396-1398.
31. Kolodny EH, Ullman MD, Mankin HJ, Raghavan SS, Topol J, Sullivan JL. Phenotypic manifestations of Gaucher disease: Clinical features in 48 biochemically verified Type I patients and comment on Type II patients. *Prog Clin Biol Res* 1982; 95: 33-65.
32. Grabowski GA, Dinur T, Gatt S, Desnick RJ. Gaucher type I (Ashkenazi) disease: Considerations for heterozygote detection and prenatal diagnosis. *Prog Clin Biol Res* 1982; 95: 573-595.
33. Matoh Y, Chazan S, Cnaan A, Gelernter I, Klibansky C. Frequency of carriers of chronic (type I) Gaucher disease in Ashkenazi Jews. *Am J Med Genet* 1987; 27: 561-565.
34. Zimran A, Gelbart T, Westwood B, Grabowski GA, Beutler E. High frequency of the 1226 mutation for type I Gaucher disease among the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 855-859.
35. Beutler E, Nguyen NJ, Henneberger MW, Smolec JM, McPherson RA, West C, et al. Gaucher disease: Gene frequencies in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 85-88.
36. Beutler E. Gaucher's Disease. *N Engl J Med* 1991; 325: 1354-1360.
37. Poorthuis B, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, Jong JG, Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 1999; 105: 151-156.
38. Meikle PJ, Hopwood J, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999; 281: 249-254.
39. Lacerda L, Amaral O, Pinto R. The N370S mutation in the glucocerebrosidase gene of Portuguese type I Gaucher patients: linkage to the Pvu II polymorphism. *J Inh Metab Dis* 1994; 17: 85-88.
40. Grabowski GA. Gaucher's disease: Enzymology, genetics and treatment. *Adv Hum Genet* 1993; 21: 377-441.
41. Brady RO, Kanfer J, Shapiro D. The metabolism of glucocerebrosidases. I. Purification and properties of a glucocerebrosidase-cleaving enzyme from spleen tissue. *J Biol Chem* 1965a; 240: 39-43.

- BIBLIOGRAFIA -

42. Mislow K. The geometry of sphingosine. *J Am Chem Soc* 1952; 74: 5155-5162.
43. Carter HE, Fujino Y. Biochemistry of the sphingolipids. IX. Configuration of cerebrosides. *J Biol Chem* 1956; 221: 879-887.
44. Nilsson O, Svennerholm L. Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *J Neurochem* 1982a; 39: 709-718.
45. Nilsson O, Grabowski GA, Ludman MD, Desnick RJ, Svennerholm L. Glycosphingolipid studies of visceral tissues and brain from type 1 Gaucher disease variants. *Clin Genet* 1985; 27: 443-450.
46. Basu S, Kaufman B, Roseman S. Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain. *J Biol Chem* 1968; 243: 5802-5804.
47. Basu S, Kaufman B, Roseman S. Enzymatic synthesis of glucocerebroside by a glycosyltransferase from embryonic chicken brain. *J Biol Chem* 1973; 248: 1388-1394.
48. Coste H, Martel MB, Azzar G, Got R. UDP-glucoseceramide glucosyltransferase from porcine submaxillary glands is associated with the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Acta* 1985; 814: 1-7.
49. Coste H, Martel MB, Got R. Topology of glucosylceramide synthesis in Golgi membranes from porcine submaxillary glands. *Biochem Biophys Acta* 1986; 858: 6-12.
50. Radin NS, Brenkert A, Arora RC, Sellinger OZ, Flangas AL. Glial and neuronal localization of cerebroside-metabolizing enzymes. *Brain Res* 1972; 39: 163-169.
51. Brenkert A, Radin NS. Synthesis of galactosylceramide and glucosylceramide by rat brain: Assay procedures and change with age. *Brain Res* 1972; 36: 183-193.
52. Sasaki T. Glycolipid transfer protein and intracellular traffic of glucosylceramide. *Experientia* 1990; 46: 611-616.
53. Platt FM, Neises GR, Dwek RA, Butters TD. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J Biol Chem* 1994; 269: 8362-8365.
54. Gatt S. Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. I. Hydrolysis and synthesis of ceramides by and enzyme from rat brain. *J Bio Chem* 1966; 241: 3724-3730.
55. Dominguez C. Alteraciones bioquímicas y enzimáticas. En: Enfermedad de Gaucher. Giraldo P, Giralt M, Pocovi M, Pérez-Calvo JI (eds). Zaragoza, 1999. Pag: 101-110.
56. Hibbs RG, Ferrans VJ, Cipriano PR, Tardiff KJ. A histochemical and electron microscopic study of Gaucher cells. *Arch Pathol* 1970; 89: 137-153.

- BIBLIOGRAFIA -

57. Strasberg PM, Warren I, Skomorwski MA, Lowden JA. HPLC analysis of neutral glycolipids: An aid in the diagnosis of lysosomal storage disease. *Clin Chim Acta* 1983; 132: 29-41.
58. Kaye EM, Ullman MD, Wilson ER, Barranger JA. Type 2 and type 3 Gaucher disease: a morphological and biochemical study. *Ann Neurol* 1986; 20: 223-230.
59. Conradi N, Kyllerman M, Mansson JE, Percy AK, Svennerholm L. Late-infantile Gaucher disease in a child with myoclonus and bulbar signs: Neuropathological and neurochemical findings. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991; 82: 152-157.
60. Nilsson O, Svennerholm L. Characterization and quantitative determination of gangliosides and neutral glycosphingolipids in human liver. *J Lipid Res* 1982; 23: 327-334.
61. Nilsson O, Hakansson G, Dreborg S, Groth CG, Svennerholm L. Increased cerebroside concentration in plasma and erythrocytes in Gaucher disease: Significant differences between type I and type III. *Clin Genet* 1982; 22: 274-279.
62. Hannun YA, Bell RM. Lysosphingolipids inhibit protein kinase C: Implications for the sphingolipidoses. *Science* 1987; 235: 670-675.
63. Fredman P. Glycosphingolipid tumour antigens. *Adv Lipid Res* 1993; 25: 213-234.
64. Conradi NG, Kalimo H, Sorander P. Reactions of vessel walls and brain parenchyma to the accumulation of Gaucher cells in Norrbottnian type (type 3) of Gaucher disease. *Acta Neuropathol* 1988; 75: 385-390.
65. Michelakakis H, Spanou S, Kondyli A, Dimitrou E, Van Weely S, Hollak C, et al. Plasma necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1317: 219-222.
66. Osiecki-Newman KM, Fabbro D, Dinur T, Boas S, Gatt S, Legler G, et al. Human acid β -glucosidase: Affinity purification of the normal placental and Gaucher disease splenic enzymes on n-alkyl-dexynojirimycin-sapharose. *Enzyme* 1986; 35: 147-153.
67. Grabowski GA, Osiecki-Newman K, Dinur T, Fabbro D, Legler G, Gatt S, et al. Human acid β -glucosidase. Use of conduritol B epoxide derivatives to investigate the catalytically active normal and Gaucher disease enzymes. *J Biol Chem* 1986; 261: 8263-8269.
68. Beutler E, Kuhl W, Sorge J. Glucocerebrosidase "processing" and gene expression in various forms of Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1062-1070.
69. Tager JM, Aerts JM, Jonsson MV, Murray GJ, van Weely S, Strijland A, et al. Molecular forms, biosynthesis and maturation of glucocerebrosidase, a membrane associated lysosomal enzyme deficient in Gaucher disease. In: Freysz L, Dreyfus H, Massarelli R, Gatt S, editors. *Enzyme of Lipid Metabolism II*. New York: Plenum Press; 1986, p 735.

- BIBLIOGRAFIA -

70. Grace ME, Newman KM, Scheiker V, Smith FI, Berg-Fussman A, Grabowski GA. Analysis of human acid β -glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *J Biol Chem* 1994; 269: 2283-2291.
71. Grace ME, Berg A, He G, Golberg L, Horowitz M, Grabowski GA. Gaucher disease: Heterologous expression of two alleles associated with neuronopathic phenotypes. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 646-655.
72. Morimoto S, Yamamoto Y, O'Brien JS, Kishimoto Y. Distribution of saposin proteins (sphingolipid activator proteins) in lysosomal storage and other diseases. *Proc Natl Acad USA* 1990; 87: 3493-3497.
73. Imai K. Characterization of β -glucosidase as a peripheral enzyme of lysosomal membranes from mouse liver and purification. *J Biochem (Tokyo)* 1985: 1405-1416.
74. Pentchev PG, Brady RO, Hibbert SR, Gal AE, Shapiro D. Isolation and characterization of glucocerebrosidase from human placental tissue. *J Biol Chem* 1973; 248: 5256-5261.
75. Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Winfield S, Barranger JA, Ginns EI. Nucleotide sequence of cDNA containing the complete coding sequence for human lysosomal glucocerebrosidase. *J Biol Chem* 1986; 261: 50-53.
76. Furbish FS, Steer CJ, Krett NL, Barranger JA. Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. *Biochem Biophys Acta* 1981; 673: 425-435.
77. Erickson A, Ginns EI, Barranger JA. Biosynthesis of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase. *J Biol Chem* 1985; 260: 14319-14324.
78. Grace ME, Berg A, He GS, Grabowski GA. Molecular enzymology of Gaucher disease. *Pediatr Res* 1992; 31: 133A.
79. Grace ME, Grabowski GA. Human acid β -glucosidase: Glycosylation is required for catalytic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 771-777.
80. Berg A, Grace ME, Grabowski GA. Human acid β -glucosidase: N-Glycosylation site occupancy and role of glycosylation in enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 673: 120-122.
81. Grabowski GA, Dinur T, Gatt S, Desnick RJ. Gaucher type I (Ashkenazi) disease: a new method for heterozygote detection using a novel fluorescent natural substrate. *Clin Chim Acta* 1982; 124: 123-135.
82. Legler G, Liedtke H. Glucosylceramide from calf spleen. Characterization of its active site with 4-alkylumbelliferyl- β -glucosides and N-alkyl derivatives of 1-deoxynojirimycin. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1985; 366: 1113-1122.
83. Dale GL, Villacorte D, Beutler E. Solubilization of glucocerebrosidase from human placenta and demonstration of a phospholipid requirement for its catalytic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 1048-1053.

- BIBLIOGRAFIA -

84. Grabowski GA, Gatt S, Kruse J, Desnick RJ. Human lysosomal β -glucosidase: Kinetic characterization of the catalytic, aglycon, and hydrophobic binding sites. *Arch Biochem Biophys* 1984; 231: 144-157.
85. Vaccaro AM, Tatti M, Ciaffoni F, Salvoli R. Factors affecting the binding of glucosylceramidase to its natural substrate dispersion. *Enzyme* 1989; 42: 87-97.
86. Glew RH, Basu A, LaMarco K, Prence EM. Mammalian glucocerebrosidase: Implications for Gaucher's disease. *Lab Invest* 1988; 58: 5-25.
87. Gonzales ML, Basu A, de Haas GH, Dijkman R, van Oort MG, Okolo AA, et al. Activation of human spleen glucocerebrosidases by monoacylglycol sulfates and diacylglycerol sulfates. *Arch Biochem Biophys* 1988; 262: 345-353.
88. Christomanou H, Aignesberger A, Linke RP. Immunochemical characterization of two activator proteins stimulating enzymic sphingomyelin degradation in vitro. Absence of one of them in a human Gaucher disease variant. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986; 367: 879-890.
89. Prence E, Chakravorti S, Basu A, Clark LS, Glew RH, Chambers JA. Further studies on the activation of glucocerebrosidase by a heat-stable factor from Gaucher spleen. *Arch Biochem Biophys* 1985; 236: 98-109.
90. Ho MW, O'Brien JS. Gaucher's disease: Deficiency of acid β -glucosidase and reconstitution of enzyme activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 2810-2813.
91. Berent BL, Radin NS. β -glucosidase activator protein from bovine spleen ("coglucosidase"). *Arch Biochem Biophys* 1981; 208: 248-260.
92. Fabbro D, Grabowski GA. Human acid β -glucosidase: Use of inhibitory and activating monoclonal antibodies to investigate the enzyme's catalytic mechanism and saposin A and C binding sites. *J Biol Chem* 1991; 266: 15021-15027.
93. Mansson JE, Vanier T, Svennerholm L. Changes in fatty acid and sphingosine composition of the major gangliosides of human brain with age. *J Neurochem* 1978; 30: 273-275.
94. Gal AE, Pentchev PG, Massey JM, Brady RO. L-glucosylceramide: synthesis, properties, and resistance to catabolism by glucocerebrosidase in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 3083-3086.
95. Sarmiento F, Scwarzmann G, Sandhoff K. Specificity of human glucosylceramide β -glucosidase towards synthetic glucosylolipids inserted into liposomes. Kinetic studies in a detergent-free assay system. *Eur J Biochem* 1986; 160: 527-535.
96. Osiecki-Nwman K, Fabbro D, Legler G, Desnick RJ, Grabowski GA. Human acid β -glucosidase: use of inhibitors, alternative substrates and amphiphiles to investigate the

- BIBLIOGRAFIA -

properties of normal and Gaucher disease active sites. *Biochem Biophys Acta* 1987; 915: 87-100.

97. Osiecki-Newman K, Legler G, Grace ME, Dinur T, Gatt S, Desnick RJ, et al. Human acid β -glucosidase: Inhibition studies using glucose analogues and pH variation to characterize the normal and Gaucher disease glycon binding sites. *Enzyme* 1988; 40: 173-188.

98. Wynn CH. A triple-binding-domain model explains the specificity of the interaction of a sphingolipid activator protein (SAP-1) with sulfatide, GM1-ganglioside and globotriaosylceramide. *Biochem J* 1986; 240: 921-924.

99. Van Paridon PA, Visser AJ, Wirtz KW. Binding of phospholipids to the phosphatidylinositol transfer protein from bovine brain as studied by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochem Biophys Acta* 1987; 898: 172-180.

100. Legler G. Labeling of the active center of a β -glucosidase. *Biochem Biophys Acta* 1968; 151: 728-729.

101. Dinur T, Osiecki KM, Legler G, Gatt S, Desnick RJ, Grabowski GA. Human acid β -glucosidase: Isolation and amino acid sequence of a peptide containing the catalytic site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1660-1664.

102. Grabowski GA, Gatt S, Horowitz M. Acid β -glucosidase: Enzymology and molecular biology of Gaucher disease. *CRC Crit Rev Biochem Mol Biol* 1990; 25: 385-414.

103. Grace ME, Graves PN, Smith FI, Grabowski GA. Analysis of catalytic activity and inhibitor binding of human acid β -glucosidase by site-directed mutagenesis. Identification of residues critical to catalysis and evidence for causality of two Ashkenazi Jewish Gaucher disease type 1 mutations. *J Biol Chem* 1990; 265: 6827-6835.

104. Jonsson LMV, Murray GJ, Sorrell SH, Strijland A, Aerts J, Ginns EI, et al. Biosynthesis and maturation of glucocerebrosidase in Gaucher fibroblasts. *Eur J Biochem* 1987; 164: 171-179.

105. Ginns EI, Brady RO, Pirruccello S, Moore C, Sorrell S, Furbish FS, et al. Mutations of glucocerebrosidase: Discrimination of neurologic and non-neurologic phenotypes of Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 5607-5610.

106. Fabbro D, Desnick RJ, Grabowski GA. Gaucher disease: Genetic heterogeneity within and among the subtypes detected by immunoblotting. *Am J Hum Genet* 1987; 40: 15-31.

107. Furbish FS, Blair HE, Shiloach J, Pentchev PG, Brady RO. Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: Large-scale purification of glucocerebrosidase suitable for human administration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3560-3563.

- BIBLIOGRAFIA -

108. Hasilik A, Neufeld EF. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues. *J Biol Chem* 1980; 255: 4946-4950.
109. Hasilik A, Neufeld EF. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem* 1980; 255: 4937-4945.
110. Fujibayashi S, Wenger DA. Studies on a sphingolipid activator protein (SAP-2) in fibroblasts from patients with lysosomal storage diseases, including Niemann-Pick disease type C. *Clin Chim acta* 1995; 146: 147-156.
111. Fürst W, Sandhoff K. Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1126: 1-16.
112. O'Brien JS, Kretz KA, Dewji NN, Wenger DA, Esch F, Fluharty AL. Coding of two sphingolipid activator proteins (SAP-1 and SAP-2) by same genetics locus. *Science* 1988; 241: 1098-1101.
113. Christomanou H, Chabás A, Pámpols T, Guardiola A. Activator protein deficient Gaucher's disease. A second patient with the newly identified lipid storage disorder. *Klin Wochenschr* 1989; 67: 999-1003.
114. Rafi MA, De Gala G, Zhang XL, Wenger DA. Mutational analysis in a patient with a variant form of Gaucher disease caused by SAP-2 deficiency. *Somat Cell Mol Genet* 1993; 19: 1-7.
115. Schnabel D, Schröder M, Sandhoff K. Mutation in the sphingolipid activator protein-2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS Lett* 1991; 284: 57-59.
116. Fujibayashi S, Kao R-T, Jones C, Morse H, Law ML, Wenger DA. Assignment of the gene for human sphingolipid activator protein-2 (SAP-2) to chromosome 10. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 741-748.
117. Inui K, Kao R-T, Fujibayashi S, Jones C, Morse H, Law ML, et al. The gene coding for a sphingolipid activator protein, SAP-2 is on chromosome 10. *Hum Genet* 1985; 69: 197-200.
118. Morimoto S, Martin BM, Yamamoto Y, Kretz KA, O'Brien JS, Kishimoto Y. Saposin A: second cerebroside activator protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3389-3393.
119. Schnabel D, Schröder M, Fürst W, Klein A, Hurwitz R, Zenk T, et al. Simultaneous deficiency of sphingolipid activator proteins 1 and 2 caused by a mutation in the initiation codon of their common gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 3312-3315.
120. Azuma N, O'Brien JS, Moser HW, Kishimoto Y. Stimulation of acid ceramidase activity by saposin D. *Arch Biochem Biophys* 1994; 311: 354-357.
121. Klein A, Henseler M, Klein C, Suzuki K, Harzer K, Sandhoff K. Sphingolipid activator protein D (SAP-D) stimulates the lysosomal degradation of ceramide "in vivo". *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 1440-1448.

- BIBLIOGRAFIA -

122. Rorman E, Grabowski GA. Molecular cloning of a human-co-beta-glucosidase cDNA: evidence that four sphingolipid hydrolase activator proteins are encoded by single genes in humans and rats. *Genomics* 1989; 5: 486-492.
123. Pámpols T, Pineda M, Girós ML, Ferrer I, Cusi V, Chabas A, et al. Neuronopathic juvenile glucosylceramidosis due to sap-C deficiency: clinical course, neuropathology and brain lipid composition in this Gaucher disease variant. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 91-97.
124. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: Structure and evolution. *Genomics* 1989; 4: 87-96.
125. Zimran A, Sorge J, Gross E, Kubitz M, West C, Beutler E. A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease. Implications for the molecular anatomy, pathogenesis and diagnosis of this disorder. *J Clin Invest* 1990; 85: 219-222.
126. Schmid CW, Jelinek WR. The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science* 1982; 216: 1065-1070.
127. Eyal N, Firon N, Wilder S, Kolodry EH, Horowitz M. Three unique base pair changes in a family with Gaucher disease. *Hum Genet* 1991; 87: 328-332.
128. Eyal N, Wilder S, Horowitz M. Prevalent and rare mutations among Gaucher patients. *Gene* 1990; 96: 277-283.
129. Hess JF, Fox M, Schmid C, Shen CK. Molecular evolution of the human adult sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 5970-5974.
130. Jagadeeswaran P, Forget BG, Weissman SM. Short interspersed repetitive DNA elements in eucaryotes: Transportable DNA elements generated by reverse transcription of RNA pol III transcripts. *Cell* 1981; 26: 141-142.
131. Long GL, Winfield S, Adolph KW, Ginns EI, Bornstein P. Structure and organization of the human metaxin gene (MTX) and pseudogene. *Genomics* 1996; 33: 177-184.
132. Adolph KW, Long GL, Winfield S, Ginns EI, Bornstein P. Structure and organization of the human thrombospondin 3 gene (THBS3). *Genomics* 1995; 27: 329-336.
133. Winfield SL, Tayebi N, Martin BM, Ginns EI, Sidransky E. Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: Implications for Gaucher disease. *Genome Res* 1997; 7: 1020-1026.
134. Satoh H, Tnai K, Yoshida MC, Sasaki M, Miwa S, Fujii H. The human liver-type pyruvate kinase (PHL) gene is on chromosome 1 at band q21. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 47: 132-133.

- BIBLIOGRAFIA -

135. Cormard B, Monfort M, Chabás A, Vilageliu L, Ginberg D. Genetic fine localization of the β -glucocerebrosidase (GBA) and prosaposin (PSAP) genes: implications for Gaucher disease. *Hum Genet* 1997; 100: 75-79.
136. Sorge J, Gross E, West C, Beutler E. High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher's disease. *J Clin Invest* 1990; 86: 1137-1141.
137. Moran D, Galperin E, Horowitz M. Identification of factors regulating the expression of human glucocerebrosidase gene. *Gene* 1997; 194: 201-213.
138. Cenarro A, Torralba M.A, Pocovi M. Genética y análisis mutacional. En: *Enfermedad de Gaucher*. Giraldo P, Giralt M, Pérez-Calvo J.I, Pocovi M (eds). Zaragoza, 1999. Pag: 124-141.
139. Grace ME, Desnick RJ, Pastores GM. Identification and expression of acid β -glucosidase mutations causing severe type 1 and neurologic type 2 Gaucher disease in non-Jewish patients. *J Clin Invest* 1997; 99: 2530-2537.
140. Beutler E, West C, Gelbart T. Polymorphisms in the human glucocerebrosidase gene. *Genomics* 1992; 12: 795-800.
141. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, et al. The Gaucher Registry. Demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med* 2000; 160: 2835-2843.
142. Beutler E, Gelbart T, Kuhl W, Zimran A, West C. Mutations in Jewish patients with Gaucher disease. *Blood* 1992; 79: 1662-1666.
143. Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ, et al. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1777-1786.
144. Grabowski GA, Horowitz M. Gaucher's disease: molecular, genetic, and enzymological aspects. *Baillieres Clin Haematol* 1997; 10: 635-656.
145. Beutler E, Gelbart T. Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24: 2-8.
146. Mistry P, Smith SJ, Hatton AM, McIntyre CSR, Smith FI. Heterogeneity of mutations in the acid β -glucosidase gene of Gaucher disease patients. *DNA Cell Biology* 1991; 10: 15-21.
147. Beutler E, Gelbart T. Gaucher disease mutations in non-Jewish patients. *Br J Haematol* 1993; 85: 401-405.
148. Eto Y, Ida H. Clinical and molecular characteristics if japanese Gaucher disease. *Neurochem Res* 1999; 24: 207-211.

- BIBLIOGRAFIA -

149. Masuno M, Tomatsu S, Sukegawa K, Orii T. Non-existence of a tight association between a 444 leucine to proline mutation and phenotypes of Gaucher disease: high frequency of a Nci I polymorphism in the non-neuronopathic form. *Hum Genet* 1990; 84: 203-206.
150. Ida H, Iwasawa K, Kawame H, Rennert OM, Maekawa K, Eto Y. Characteristics of gene mutations among 32 unrelated japanese Gaucher disease: absence of the common Jewish 84GG and 1226 mutations. *Hum Genet* 1995; 95: 717-720.
151. Ida H, Rennert OM, Iwasawa K, Kobayashi M, Eto Y. Clinical and genetic studies of japanese homozygotes for the Gaucher disease L444P mutation. *Hum Genet* 1999; 105: 120-126.
152. Choy FYM, Wong K, Shi H. Glucocerebrosidase mutations among chinese neuronopathic and non-neuronopathic Gaucher disease patients. *Am J Med Genet* 1999; 84: 484-486.
153. Cormand B, Harboe T, Gort L, Campoy C, Blanco M, Chamoles N, et al. Mutation analysis of Gaucher disease patients from Argentina: High prevalence of the RecNciI mutation. *Am J Med Genet* 1998; 80: 343-351.
154. Horowitz M, Tzuri G, Eyal N, Berebi A, Kolodny EH, Brady RO, et al. Prevalence of 9 mutations among Jewish and non-Jewish Gaucher disease patients. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 921-930.
155. Cormand B, Grinberg D, Gort L, Chabás A, Vilageliu L. Molecular analysis and clinical findings in the spanish Gaucher disease population: Putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Hum Mutat* 1998; 11: 295-305.
156. Nelson PV, Carey WF, Morris CP, Lewis BD. Mutation analysis of australasian Gaucher disease patients. *Am J Med Genet* 1995; 58: 382.
157. Giraldo P, Pocovi M, Pérez-Calvo JI, Rubio-Felix D, Giralt M. Report of the Spanish Gaucher's Disease Registry: clinical and genetic characteristics. *Haematologica* 2000; 85: 792-799.
158. Balicki D, Beutler E. Gaucher disease. *Medicine* 1995; 74: 305-323.
159. Amaral O, Marcao A, Pinto E, Sa Miranda MC. Prevalence of glucocerebrosidase mutations in Portugal. Second Workshop of the European Working Group on Gaucher Disease, Maastricht, 1997. Abstract Book; p. 37-8.
160. Chabas A, Cormand B, Grinberg D, Burguera JM, Balcells S, Merino JL, et al. Unusual expression of Gaucher's disease: cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation. *J Med Genet* 1995; 32: 740-742.
161. Chabas A, Cormand B, Balcells S, Gonzalez-Duarte R, Casanova C, Colomer J, et al. Neuronopathic and non-neuronopathic presentation of Gaucher disease in patients with the third most common mutation (D409H) in Spain. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 798-800.

- BIBLIOGRAFIA -

162. Sarria AJ, Giraldo P, Pérez-Calvo JI, Pocovi M. Detection of three rare (G377S, T134P and 1451delAC), and two novel mutations (G195W and Rec(1263del55;1342G>C)) in Spanish Gaucher disease patients. *Mutation in brief* no. 251. Online. *Hum Mutat* 1999; 14: 88.
163. Cormand B, Vilageliu L, Balcells S, González-Duarte R, Chabas A, Grinberg D. Two novel (1098insA and Y313H) and one rare (R359Q) mutations detected in exon 8 of the beta-glucocerebrosidase gene in Gaucher's disease patients. *Hum Mutat* 1996; 7: 272-274.
164. Cormand B, Grinberg D, Gort L, Fiumara A, Borone R, Vilageliu L, et al. Two new mild homozygous mutations in Gaucher disease patients: clinical signs and biochemical analyses. *Am J Med Genet* 1997; 70: 437-443.
165. Cormand B, Grinberg D, Gort L, Chabas A, Vilageliu L. Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Hum Mutat* 1998; 11: 295-305.
166. Torralba MA, Pérez-Calvo JI, Pastores GM, Cenarro A, Giraldo P, Pocovi M. Identification and characterization of a novel mutation c.1090G>T (G325W) and nine common mutant alleles leading to Gaucher disease in Spanish patients. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 489-495.
167. Tsuji S, Martin BM, Barranger JA, Stubblefield BK, LaMarca ME, Ginns EI. Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher's disease: Multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2349-2352.
168. Sibille A, Eng CM, Kim SJ, Pastores G, Grabowski GA. Phenotype/genotype correlations in Gaucher disease type 1: clinical and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 1094-1101.
169. Zimran A, Sorge J, Gross E, Kubitz M, West C, Beutler E. Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level. *Lancet* 1989; 2: 349-352.
170. Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, Dambrosia JM, Banerjee TK, McKee MA, et al. Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann Intern Med* 1995; 121: 69-75.
171. Giraldo P, Pérez-Calvo JI, Giralt M, Pocovi M. Clinical characteristics of Gaucher's disease in Spain. Preliminary results of a national inquiry. *Med Clin (Barcelona)* 1997; 109: 619-622.
172. Díaz A, Montfort M, Cormand B, Zeng B, Pastores G, Chabás A, et al. Gaucher disease: the N370S mutation in Ashkenazi Jewish and Spanish patients has a common origin and arose several thousand years ago. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1233-1238.

- BIBLIOGRAFIA -

173. Díaz GA, Gelb BD, Risch N, Torbjoern G, Nygaard, Frisch A, et al. Gaucher Disease: The origins of the ashkenazi jewish N370S and 84GG acid β -glucosidase mutations. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1821-1832.
174. Colombo R. Age estimate of the N370S mutation causing Gaucher disease in ashkenazi jews and european populations: A reappraisal of haplotype data. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 692-697.
175. Goldstein DB, Reich DE, Bradman N, Usher S, Seligsohn U, Peretz H. Age estimates of two common mutations causing factor XI deficiency: recent genetic drift is not necessary for elevated disease incidence among ashkenazi jews. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1071-1075.
176. Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Stubblefield BK, Mayor JA, Barranger JA, et al. A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1987; 316: 570-575.
177. Dahl N, Erikson A, Hammrstrom-Heeroma K, Petersson U. Tight linkage between type III Gaucher's (Norrbottnian type) and MspI polymorphism within the gene for human glucocerebrosidase. *Genomics* 1988; 3: 296-298.
178. Kawame H, Maekawa K, Eto Y. Molecular screening of japanese patients with Gaucher disease: phenotypic variability in the same genotypes. *Hum Mutat* 1993; 2: 362-367.
179. Cox TM, Schofield JP. Gaucher disease: clinical features and natural history. *Baillieres Clin Haematol* 1997; 10: 657-689.
180. Beutler E, Gelbart T, Kuhl W, Sorge J, West C. Identification of the second common jewish Gaucher's disease mutation makes possible population based screening for the heterozygote state. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10544-10547.
181. He GS, Grabowski GA. Gaucher disease: $AG^{-1} \rightarrow A^{-1}$ IVS2 splice donor mutation causing exon skipping in the β -glucosidase mRNA. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 810-820.
182. Theophilus B, Latham T, Grabowski GA, Smith FI. Gaucher disease: Molecular heterogeneity and phenotype-genotype correlations. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 212-225.
183. Ohasi T, Hong CM, Barranger JA. Characterization of glucocerebrosidase from different mutant alleles. *J Biol Chem* 1991; 226: 3661-3667.
184. Brady RO, Barton NW, Grabowski GA. The role of neurogenetics in Gaucher disease. *Arch Neurol* 1993; 50: 1212-1224.
185. Beutler E, Gelbar T, West C. Identification of six new Gaucher disease mutations. *Genomics* 1993; 15: 203-205.

- BIBLIOGRAFIA -

186. Torralba M, Alfonso P, Pérez-Calvo JI, Civeira F, Cenarro A, Giraldo P, et al. High prevalence of false N370S homozygous caused by the GBA Δ 55bp exon 9 among Gaucher's disease spanish patients. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 60.
187. Latham T, Grabowski GA, Theophilus BDM, Smith FI. Complex alleles of the acid β -glucosidase gene in Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 79-86.
188. Grace ME, Ashton-Prolla P, Pastores G, Soni A, Desnick RJ. Non-pseudogene-derived complex acid β -glucosidase mutations causing mild type 1 and severe type 2 Gaucher disease. *J Clin Invest* 1999; 103: 817-823.
189. Giraldo P. Enfermedad de Gaucher tipo 1. En : Enfermedad de Gaucher. Giraldo P, Giralto M, Pocoví M, Pérez-Calvo JI (eds). RS editorial. Zaragoza, 1999. Pag 65-79.
190. Knudson AG, Kaplan WD. Genetics of the sphingolipidoses. In: Cerebral Sphingolipidoses. Aronson SM, Volk BW (eds). New York 1962: academic press. Pag 395.
191. Mistry PK. Genotype/phenotype correlations in Gaucher's disease. *Lancet* 1995; 346: 982-983.
192. Beutler E. Gaucher disease. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 19-23.
193. Barton D, Ludman M, Benkov K, Grabowski GA, LeLeiko NS. Resting energy expenditure in Gaucher's disease type 1: effect of Gaucher cells burden on energy requirements. *Metabolism* 1989; 38: 1238-1243.
194. Damiano AM, Pastores GM, Ware Jr JE. The health-related quality of life of adults with Gaucher's disease receiving enzyme replacement therapy: results from a retrospective study. *Qual Life Res* 1998; 7: 373-386.
195. Zimran A, Kay A, Gelbart T. Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic and genetic features of 53 patients. *Medicine (Baltimore)* 1992; 71: 337-353.
196. James SP, Stromeyer FW, Chang C, Barranger JA. Liver abnormalities in patients with Gaucher's disease. *Gastroenterology* 1981; 80: 126-131.
197. Aderka D, Garfinkel D, Rothem A, Pinkhas J. Fatal bleeding from oesophageal varices in a patient with Gaucher's disease. *Am J Hematol* 1982; 77: 838-839.
198. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Zimran A. Abdominal ultrasound findings mimicking hematological malignancies in a study of 218 Gaucher patients. *Am J Hematol* 1997; 55: 28-34.
199. Zimran A, Elstein D, Schiffman R, Abrahamov A, Goldberg M, Bar-Maor JA, et al. Outcome of partial splenectomy for type I Gaucher disease. *J Pediatr* 1995; 126: 596-597.

- BIBLIOGRAFIA -

200. Mistry PK, Davies S, Corfield A, Dixon AK, Cox TM. Successful treatment of bone marrow failure in Gaucher's disease with low-dose modified glucocerebrosidase. *Q J Med* 1992; 84: 541-546.
201. Seligsohn U, Zitman D, Many A, Klibansky C. Coexistence of factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency and Gaucher's disease. *Isr J Med Sci* 1976; 12: 1448-1452.
202. Incerti C. Gaucher disease: an overview. *Semin Hematol* 1995; 32 (Suppl 1): 3-9.
203. Gillis S, Hyam E, Abrahamov A, Elstein D, Zimran A. Platelet function abnormalities in Gaucher disease patients. *Am J Hematol* 1999; 61: 103-106.
204. Charrow J, Esplin JA, Gribble J, Kaplan P, Kolodny H, Pastores GM, et al. Gaucher disease. Recommendations on diagnosis, evaluation and monitoring. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1754-1760.
205. Hermann G, Pastores GM, Abdelwahab IF, Lorberboym AM. Gaucher disease: assesment of skeletal involvement and therapeutic responses to enzyme replacement. *Skeletal Radiol* 1997; 26: 687-696.
206. Ida H, Rennert OM, Kato S, Ueda T, Oishi K, Maekawa K, et al. Severe skeletal complications in Japanese patients with type 1 Gaucher disease. *J Inher Metab Dis* 1999; 22: 63-73.
207. Gery I, Zigler JS, Brady RO, Barranger JA. Selective effectos of glucocerebroside (Gaucher's storage material) on macrophage cultures. *J Clin Invest* 1981; 68: 1182-1189.
208. Lacerda L, Arosa FA, Lacerda R, Cabeda J, Porto G, Amaral O, et al. T cell numbers relate to bone involvement in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25: 130-138.
209. Stowens DW, Teitelbaum SL, Kahn AJ, Barranger JA. Skeletal complications of Gaucher disease. *Medicine (Baltimore)* 1985; 64: 310-322.
210. Yossipovitch ZH, Hermann G, Mankin M. Aseptik osteomyelitis in Gaucher disease. *Isr J Med Sci* 1965; 1: 531-533.
211. Pastores GM, Einhorn TA. Skeletal complications of Gaucher's disease: pathophysiology, evaluation and treatment. *Semin Hematol* 1995; 32 suppl 1: 20-27.
212. Strickland B. Skeletal manifestations of Gaucher disease with some unusual findings. *Br J Radiol* 1958; 31: 246.
213. Pastores GM, Wallenstein S, Desnick RJ, Luckey M. Bone density in type 1 Gaucher disease. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1801-1807.

- BIBLIOGRAFIA -

214. Hermann G, Shapiro R, Abdelwahab FI, Klein MJ, Pastores GM, Grabowski GA. Extraosseous extension of Gaucher cell deposits mimicking malignancy. *Skeletal Radiol* 1994; 23: 253-256.
215. Garfinkel D, Sidi Y, Ben-Bassat M, Solomon F, Hazaz B, Pinkhas J. Coexistence of Gaucher's disease and multiple myeloma. *Arch Intern Med* 1982; 142: 2229-2230.
216. Minchew JT, Dawson EG. The spine and Gaucher disease. *Gaucher Clin Perspect* 1994; 2: 5-7.
217. Hermann G, Wagner LD, Gendal ES, Ragland RL, Ulin RI. Spinal cord compression in type I Gaucher disease. *Radiology* 1989; 170: 147.
218. Hermann G, Goldblatt J, Levy RN, Goldsmith SJ, Desnick RJ, Grabowski GA. Gaucher's disease type 1: assessment of bone involvement by CT and scintigraphy. *AJR* 1986; 147: 943-948.
219. Rosenthal DI, Scott JA, Barranger J, Mankin HJ, Saini S, Brady TJ, et al. Evaluation of Gaucher disease using magnetic resonance imaging. *J Bone Joint Surg Am* 1986; 68: 802-808.
220. Hermann G, Shapiro RS, Abdelwahab IF, Grabowski GA. MR imaging in adults with Gaucher disease type I: evaluation of marrow involvement and disease activity. *Skeletal Radiol* 1993; 22: 247-251.
221. Bilchik TR, Heyman S. Skeletal scintigraphy of pseudo-osteomyelitis in Gaucher's disease. *Clin Nucl Med* 1982; 17: 279.
222. Kenan S, Abdelwahab IF, Hermann G, Klein M, Pastores G. Osteoblastoma of the humerus associated with type 1 Gaucher's disease. *J Bone Joint Surg* 1996; 78: 702-705.
223. Roca M, Mota J. Estado actual del diagnóstico por imagen en la enfermedad de Gaucher tipo 1. *Sangre* 1997; 43: 155-157.
224. Rosenthal DI, Barton NW, McKusick KA, Rosen BR, Hill SC, Casatrovono FP, et al. Quantitative imaging of Gaucher disease. *Radiology* 1992; 185: 841-845.
225. Rosenthal DI, Mayo-Smith W, Goodsitt MM, Doppelt S, Mankin HJ. Bone and bone marrow changes in Gaucher disease: evaluation with quantitative CT. *Radiology* 1989; 170: 143-146.
226. Starer F, Sargent JD, Hobbs JR. Regression of the radiological changes of Gaucher's disease following bone marrow transplantation. *Br J Radiol* 1987; 60: 1189-1195.
227. Roca M. Aplicaciones diagnósticas y pronósticas de las técnicas de imagen. En: *Enfermedad de Gaucher*. Giraldo P, Giralt M, Pocovi M, Pérez-Calvo JI (eds). RS editorial. Zaragoza, 1999. Pag 151-162.

- BIBLIOGRAFIA -

228. Rademakers RP. Radiologic evaluation of Gaucher disease. *Semin Hematol* 1995; 32: 14-19.
229. Horev G, Kornreich L, Hadar H, Katz K. Hemorrhage associated with bone crisis in Gaucher's disease identified by magnetic resonance imaging. *Skeletal Radiol* 1991; 20: 479-482.
230. Espin JA, McPherson EJ. Treatment of bone complications in patients with Gaucher disease. *Gaucher Clin Perspect* 1994; 2: 7-11.
231. Johnson LA, Hoppel BE, Gerard EL, Miller SP, Doppelt SH, Zirzow GC, et al. Quantitative chemical shift imaging of vertebral bone marrow in patients with Gaucher disease. *Radiology* 1992; 182: 451-455.
232. Elstein D, Itzchaki M, Mankin HJ. Skeletal involvement in Gaucher's disease. *Clin Haematol* 1997; 10: 793-816.
233. Tunaci A, Berkman YM, Gokmen E. Pulmonary Gaucher's disease: high-resolution computed tomographic features. *Pediatr Radiol* 1995; 25: 237-238.
234. Kerem E, Elstein D, Abrahamov A, Bar Ziv Y, Hadas-Halpern I, Melzer E, et al. Pulmonary function abnormalities in type I Gaucher disease. *Eur J Res Dis* 1996; 9: 340-345.
235. Theise ND, Ursell PC. Pulmonary hypertension and Gaucher's disease: logical association or mere coincidence? *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12: 74-76.
236. Wisch JS. Siblings with pulmonary hypertension and Gaucher disease. *Gaucher Clin Perspect* 1996; 4: 10-12.
237. Harats D, Pauzner R, Elstein D, Many A, Klutstein MW, Kramer MR, et al. Pulmonary hypertension in two patients with type I Gaucher disease while on alglucerase therapy. *Acta Haematol* 1997; 98: 47-50.
238. Elstein D, Klutstein M, Lahad A, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Zimran A. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension in Gaucher's disease. *Lancet* 1998; 351: 1544-1546.
239. Dawson A, Elias DJ, Rubenson D, Bartz SH, Garver PR, Kay AC, et al. Pulmonary hypertension developing after alglucerase therapy in two patients with type 1 Gaucher disease complicated by the hepatopulmonary syndrome. *Ann Intern Med* 1996; 125: 901-904.
240. Elstein D, Klutstein A, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Zimran A. Pulmonary hypertension in untreated and treated patients with Gaucher disease. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 20.
241. Pastores G, Miller A. Pulmonary hypertension in Gaucher's disease. *Lancet* 1998; 352: 580.

- BIBLIOGRAFIA -

242. Mistry PK, Chung H, Wallenstein S, Sirrs S, Desnick RJ, Goldman M. Pulmonary hypertension in type 1 Gaucher disease - The Mount Sinai Study. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 39.
243. Pelini M, Boice D, O'Neil K, LaRocque J. Glucocerebrosidase treatment of type I Gaucher disease with severe pulmonary involvement. *Ann Intern Med* 1994; 121: 196-197.
244. Wollstein G, Elstein D, Zimran A. Ocular findings in type I Gaucher disease. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 69.
245. Mistry PK, Abrahamov A. A practical approach to diagnosis and management of Gaucher's disease. *Baillière Clin Haematol* 1997; 10: 817-838.
246. Smith RL, Hutchins GM, Sack GF Jr, Ridolfi RL. Unusual cardiac, renal and pulmonary involvement in Gaucher's disease. Interstitial glucocerebroside accumulation, pulmonary hypertension and fatal bone marrow embolization. *Am J Med* 1978; 65: 352-360.
247. Tamari I, Moto M, Neufeld HN. Unusual pericardial calcification in Gaucher's disease. *Arch Intern Med* 1983; 143: 2010-2011.
248. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type 1 Gaucher's disease. *Q J Med* 1996; 89: 691-694.
249. Henderson JM, Gilinsky NH, Lee EY, Greenwood MF. Gaucher's disease complicated by bleeding oesophageal varices and colonic infiltration by Gaucher cells. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 346-348.
250. Fox H, Mc Carthy P, Andre-Schwartz J, Shoenfeld Y, Miller KB. Gaucher disease and chronic lymphocytic leukemia. Possible pathogenetic link between Gaucher disease and B-cell proliferations? *Cancer* 1984; 54: 312-314.
251. Giraldo P, Pocovi M, Pérez-Calvo JI, Giralto M. Plasma protein alterations in Gaucher disease. *Boletín da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 1998; 20 (Supl): 135.
252. Aerts JMFG, Hollak CEM. Plasma and metabolic abnormalities in Gaucher's disease. *Baillière's Clin Haematol* 1997; 10: 691-709.
253. Lee RE. The natural history and pathology of Gaucher's disease. Technology Assessment Conference. National Institute of Health. Bethesda Maryland 1995; 23-25.
254. Hanash SM, Rucknaseil DL, Heidelberger KP, Radin NS. Primary amyloidosis associated with Gaucher's disease. *Ann Intern Med* 1978; 19: 639-641.

- BIBLIOGRAFIA -

255. Mengel E, Bahner F, Sextro K, Edelmann M, Ries M, Beck M. Autoimmune thyroiditis in two patients with Gaucher disease. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 38.
256. Granovsky-Grisaru S, Aboutafia Y, Diamant YZ, Horowitz M, Abrahamov A, Zimran A. Gynecologic and obstetric aspects of Gaucher's disease: a survey of 53% patients. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 1284-1290.
257. Rosnes JS, Sharken MF, Veille JC, Mueller-Heubach E. Gaucher's disease in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1996; 51: 549-558.
258. Goldblatt J, Beighton P. Obstetric aspects of Gaucher disease. *Br J Obstet* 1985; 92: 145-149.
259. Elstein D, Granovsky-Grisaru S, Rabinowitz R, Kanai R, Abrahamov A, Zimran A. Use of enzyme replacement therapy for Gaucher disease during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1509-1512.
260. Aporta R, Escobar JL, Navarro AM, Aguilar G, Cabrera A. Alglucerase enzyme therapy used safely and effectively throughout the whole pregnancy of a Gaucher disease patient. *Haematologica* 1998; 83: 852-853.
261. Sakarelou N, Kosmaidou Z, Mesogitis S, Dimitriou E, Michelakakis H. Pregnancy in Gaucher disease. *Eur J Obstet Gynecol* 1999; 83: 113-114.
262. Kaplan P, Mazur A, Manor O, Charrow J, Esplin J, Gribble J, et al. Acceleration of retarded growth in children with Gaucher disease after treatment with alglucerase. *J Pediatr* 1996; 129: 149-153.
263. Kauli R, Zaizov R, Lazar L, Pertzalan A, Laron Z, Galatzer A, et al. Delayed growth and puberty in patients with Gaucher disease type 1: natural history and effect of splenectomy and/or enzyme replacement therapy. *Isr Med Assoc J* 2000; 2: 158-163.
264. Boot RG, Hollak CEM, Verhoek M, Sloof P, Poorthuis BJ, Kleijer WJ. Glucocerebrosidase genotype of Gaucher disease patients in the Netherlands: limitations in prognostic value for expression of the disease and response to therapy. *Hum Mutat* 1997; 10: 348-358.
265. Beutler E, Gelbart T. Mutation update. Glucocerebrosidase (Gaucher disease). *Hum Mutat* 1996; 8: 207-213.
266. Roca M, Giraldo P, Pérez-Calvo JI, Rubio-Felix D, Giralt M. Bone marrow involvement in type I Gaucher disease: Assessment by MRI. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 49.
267. Baldellou A. Enfermedad de Gaucher tipos 2 y 3. En: *Enfermedad de Gaucher*. Giraldo P, Giralt M, Pocovi M, Pérez-Calvo JI (eds). RS editorial. Zaragoza, 1999. Pag 81-90.

- BIBLIOGRAFIA -

268. Kaminsky P, Belmatoug N, Billette de Villemeur T. Maladie de Gaucher. *Presse Med* 1996; 25: 108-112.
269. Pasmanik-Chorn M, Laadan S, Elroy-Stein O, Zimran A, Abrahamov A, Gatts S, et al. The glucocerebrosidase D409H mutation in Gauche disease. *Biochem Mol Med* 1996; 52: 125-133.
270. Rice EO, Mifflin TE, Sakallah S, Lee RE, Sansieri CA, Barranger JA. Gaucher disease: studies of phenotype, molecular diagnosis and treatment. *Clin Genet* 1996; 49: 111-118.
271. Yoshikawa H, Fueki N, Sasaki M, Sakuragawa N. Uncoupling of blood flow and oxygen metabolism in the cerebellum in type 3 Gaucher disease. *Brain Dev* 1991; 13: 190-192.
272. Holleran WM, Ginns EI, Menon GK, Grundmann JU, Fartasch M, McKinney CE, et al. Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermidis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994; 93: 1756-1764.
273. Meivar-Levy I, Horowitz M, Futerman AH. Analysis of glucocerebrosidase activity using N-(1(14)hexanoyl-D-erythroglucosylsphingosine demonstrates a correlation between levels of residual enzyme activity and the type of Gaucher disease. *Biochem J* 1994; 303: 377-382.
274. Sakura N, Mizoguchi N, Ueda H, Fujita A. Clinical significance of Gaucher cells in cerebrospinal fluid. *Acta Paediatr* 1999; 88: 104-105.
275. Orvisky E, Sidransky E, McKinney C, LaMarca ME, Samimi R, Krasnewich D, et al. Glucosylsphingosine accumulation in mice and patients with type 2 Gaucher disease begins early in gestations. *Pediatr Res* 2000; 48: 233-237.
276. Fujimoto A, Tayebi N, Sidransky E. Congenital ichthyosis preceding neurologic symptoms in two sibs with type 2 Gaucher disease. *Am J Med Genet* 1995; 59: 356-358.
277. Sidransky E, Fartasch M, Lee RE, Metlay LE, Abella S, Zimran A, et al. Epidermal abnormalities may distinguish type 2 from type 3 Gaucher disease. *Pediatr Res* 1996; 39: 131-141.
278. Erikson A, Bembi B, Schiffmann R. Neuronopathic forms of Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol* 1997; 10: 711-723.
279. Liu K, Commens C, Chong R, Jaworski R. Collodion babies with Gaucher disease. *Arch Dis Child* 1988; 63: 854-856.
280. Lipson AH, Rogers M, Berry A. Collodion babies with Gaucher disease: a further case. *Arch Dis Child* 1991; 66: 667.

- BIBLIOGRAFIA -

281. Sidransky E, Sherer DM, Ginns EI. Gaucher disease in the neonate: a distinct Gaucher phenotype is analogous to a mouse model created by targeted disruption of the glucocerebrosidase gene. *Pediatr Res* 1992; 32: 494-498.
282. Rowlands S, Murray H. Prenatal ultrasound findings in a fetus diagnosed with Gaucher disease (type 2) at birth. *Prenat Diagn* 1997; 17: 765-769.
283. Sherer DM, Metlay LA, Sinkin RA, Mongeon C, Lee RE, Woods JR. Congenital ichthyosis with restrictive dermopathy and Gaucher's disease: a new syndrome with associated prenatal diagnostic and pathology findings. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 843-844.
284. Ince Z, Coban A, Peker O, Ince U, Can G. Gaucher disease associated with congenital ichthyosis in the neonate. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 418.
285. Stone DL, van Diggelen OP, de Klerk JBC, Gaillard JJJ, Niermeijer MF, Willemsen R, et al. Is the perinatal lethal form of Gaucher disease more common than classic type 2 Gaucher disease? *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 505-509.
286. Stone DL, Carey WF, Christodoulou J, Sillence D, Nelson P, Callahan M, et al. Type 2 Gaucher disease: the collodion baby phenotype revisited. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000; 82: F163-F166.
287. Finn LS, Zhang M, Chen SH, Scott R. Severe type II Gaucher disease with ichthyosis, arthrogyrosis and neuronal apoptosis: Molecular and pathological analyses. *Am J Med Genet* 2000; 91: 222-226.
288. González G, Cidras M, Domínguez F, Vázquez C. Enfermedad de Gaucher en el neonato: dos nuevos casos. *RELAN* 1999; 1: 144-146.
289. Shihara T, Oka A, Suzaki I, Ida H, Takeshita K. Communicating hydrocephalus in a patient with Gaucher's disease type 3. *Pediatr Neurol* 2000; 22: 234-236.
290. Inui K, Yanagihara K, Otani K, Suzuki Y, Akagi M, Nakayama M, et al. A new variant neuropathic type of Gaucher's disease characterized by hydrocephalus, corneal opacities, deformed toes, and fibrous thickening of spleen and liver capsules. *J Pediatr* 2001; 138: 137-139.
291. Harris CM, Taylor DSI, Vellodi A. Ocular motor abnormalities in Gaucher disease. *Neuropediatrics* 1999; 30: 289-293.
292. Verghese J, Goldberg RF, Desnick RJ, Grace ME, Goldman JE, Sunhee C, et al. Myoclonus from selective dentate nucleus degeneration in type 3 Gaucher disease. *Arch Neurol* 2000; 57: 389-395.
293. Garvey MA, Toro C, Goldstein S, Altarescu G, Wiggs EA, Hallet M, et al. Somatosensory evoked potentials as a marker of disease burden in type 3 Gaucher disease. *Neurology* 2001; 56: 391-394.

- BIBLIOGRAFIA -

294. Bohlega S, Kambouris M, Shahid M, Al Homsy M, Al Sous W. Gaucher disease with oculomotor apraxia and cardiovascular calcification (Gaucher type IIC). *Neurology* 2000; 54: 261-263.
295. Cogan DG, Chu FC, Reingold D, Barranger J. Ocular motor signs in some metabolic diseases. *Arch Ophthalmol* 1981; 99: 1802-1808.
296. Abrahamov A, Elstein D, Gross-Tsur V, Farber B, Glaser Y, Hadas-Halpern I, et al. Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet* 1995; 346: 1000-1003.
297. Beutler E, Kattamis C, Sipe J, Lipson M. 1342C mutation in Gaucher's disease. *Lancet* 1995; 346: 1637.
298. Ullman MD, McCluer RH. Quantitative analysis of plasma neutral glycosphingolipids by high performance liquid chromatography of their perbenzoyl derivatives. *J Lipid Res* 1977; 18: 371-378.
299. Aerts J, Hollak CEM. Plasma and metabolic abnormalities in Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol* 1997; 10: 691-709.
300. Erikson A, Johansson K, Mansson JE, Svennerholm L. Enzyme replacement therapy of infantile Gaucher disease. *Neuropediatrics* 1993; 24: 237-238.
301. Erikson A, Astrom M, Mansson J. Enzyme infusion therapy of the Norrbottnian type (type 3) Gaucher disease. *Neuropediatrics* 1995; 26: 203-207.
302. Ginsberg H, Grabowski GA, Gibson JC, Fagestrom R, Goldblatt J, Gilbert HS, et al. Reduced plasma concentrations of total, low density lipoprotein and high density lipoprotein cholesterol in patients with Gaucher type 1 disease. *Clin Genet* 1984; 26: 109-116.
303. Le NA, Gibson JC, Rubinstein A, Grabowski GA, Ginsberg H. Abnormalities in lipoprotein metabolism in Gaucher type 1 disease. *Metabolism* 1988; 37: 240-245.
304. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989; 321: 1311-1316.
305. Cenarro A, Civeira F, Pocoví M. Marcadores bioquímicos secundarios. En: *Enfermedad de Gaucher*. Giraldo P, Giralto M, Pocovi M, Pérez-Calvo JI (eds). Zaragoza, 1999. Pag 111-121.
306. Cenarro A, Pocoví M, Giraldo P, García-Otin AL, Ordovas JM. Plasma lipoprotein responses to enzyme-replacement in Gaucher's disease. *Lancet* 1999; 353: 642-64
307. Amaral O, Lacerda L, Santos R, Pinto R, Aerts J, Sa Miranda MC. Type I Gaucher disease: molecular, biochemical and clinical characterization of patients from Northern Portugal. *Biochem Med Metab Biol* 1993; 49: 97-107.

- BIBLIOGRAFIA -

308. Lacerda L, Amaral O, Pinto R, Oliveira P, Aerts J, Sa Miranda MC. Gaucher disease: N370S glucocerebrosidase gene frequency in the portuguese population. *Clin Genet* 1994; 45: 298-300.
309. Pocovi M, Cenarro A, Civeira F, Torralba MA, Perez-Calvo JI, Mozas P, et al. β -glucocerebrosidase gene locus as a link for Gaucher's disease and familial hypo- α -lipoproteinemia. *Lancet* 1998; 351: 1919-1923.
310. Gilbert HS, Weinreb N. Increased circulating levels of transcobalamin II in Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1976; 295: 1096-1101.
311. Abrahamov A, Gielchinsky Y, Zimran A, Elstein D, Algur N, Shinar E, et al. Vitamin B12 deficiency in Gaucher disease. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 1.
312. Niederau C, Birkhahn A, Ehlen C, Haussinger D. Facts and fiction of modern diagnosis of type 1 Gaucher disease. The German experience in 1996. *Gaucher Clin Perspect* 1996; 2: 5-14.
313. Bassan R, Montanelli A, Barbui T. Interaction between a serum factor and T lymphocytes in Gaucher disease. *Am J Hematol* 1985; 18: 381-384.
314. Pratt PW, Estern S, Kochwa J. Immunoglobulin abnormalities in Gaucher's disease: report of 16 cases. *Blood* 1968; 31: 633-640.
315. van Oers MHJ, van Zaanen HC, Lokhorst HM. Interleukin-6, a new target for therapy in multiple myeloma? *Ann Hematol* 1993; 66: 219-223.
316. Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N, Cox TM. Proinflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *Q J Med* 1997; 90: 19-25.
317. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines and bone remodelling emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 305-311.
318. Hollak CEM, Evers L, Aerts J, van Oers MHJ. Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL-8 in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23: 201-212.
319. Corssmit E, Hollak CEM, Endert E, van Oers MHJ, Sauerwein HP, Romijn JA. Increased basal glucose production in type 1 Gaucher disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2653-2657.
320. Bodamer OAF, Vellodi A. Protein, glucose and energy metabolism in Gaucher disease type 1. *J Inher Metab Dis* 2000; 23: 86-87.
321. Pérez-Calvo JI, Iñigo P, Giraldo P, Torralba MA, Civeira F, Lara S, et al. Transforming growth factor β (TGF- β) en la enfermedad de Gaucher. Resultados preliminares en un grupo de enfermos y familiares portadores y no portadores. *Med Clin (Barc)* 2000; 115; 601-604.

- BIBLIOGRAFIA -

322. Stanley ER, Heard PM. Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L-cells. *J Biol Chem* 1977; 252: 4305-4312.
323. Corboz AV, Cecchini MG, Felix R, Fleisch H, van der Pluijm G, Lowik CW. Effect of macrophage colony-stimulating factor on in vitro osteoclast generation and bone resorption. *Endocrinology* 1992; 130: 437-442.
324. Ishibashi S, Inaba T, Shimano H, Harada K, Inoue I, Mokuno H, et al. Monocyte colony stimulating factor enhances uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins and cholesterol esterification in human monocyte derived macrophages. *J Biol Chem* 1990; 265: 14109-14117.
325. Berrebi A, Malnick SDH, Vorst EJ, Stein D. High incidence of factor XI deficiency in Gaucher's disease. *Am J Hematol* 1992; 40: 153-161.
326. Hollak C, Levi M, Berends F, Aerts JM, van Oers MH. Coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease are due to low grade activation and can be partly restored by enzyme supplementation therapy. *Br J Haematol* 1997; 96: 470-476.
327. Hultber B, Isaksson A, Sjöblad S, Ockerman PA. Acid hydrolases in serum from patients with lysosomal disorders. *Clin Chim Acta* 1980; 100: 33-38.
328. Natowicz MR, Prence EM, Cajolet A. Marked variation in blood beta-hexosaminidase in Gaucher disease. *Clin Chim Acta* 1992; 203: 17-22.
329. Chitayat DJ, Nakagawa S, Marion RW, Sachs GS, Shinnar S, Llana JF, et al. Elevation of serum beta-hexosaminidase and alfa D-mannosidase in type 2 Gaucher disease: a clinical and biochemical study. *J Inher Metab Dis* 1987; 10: 111-114.
330. Silverstein E, Friedland J. Elevated serum and spleen angiotensin converting enzyme and serum lysozyme in Gaucher's disease. *Clin Chim Acta* 1977; 74: 21-25.
331. Tuchman LR, Goldstein G, Clyman M. Studies on the nature of the increased acid phosphatase in Gaucher's disease. *Am J Med* 1959; 27: 959-962.
332. Lord DK, Cross NC, Bevilacqua MA, Rider SH, Gorman PA, Groves AV, et al. Type 5 acid phosphatase. Sequence, expression and chromosomal localization of a differentiation-associated protein o the human macrophage. *Eur J Biochem* 1990; 189: 287-293.
333. Chambers JB, Aquino L, Glew RH, Lee RE, McCafferty LR. Determination of serum acid phosphatase in Gaucher's disease using 4-methylumbelliferyl phosphate. *Clin Chim Acta* 1977; 80: 67-77.
334. Magelhaes J, Pinto R, Lemos M, Sa Miranda MC, Poenaru L. Age dependency of serum acid phosphatase in controls and Guacher patients. *Enzyme* 1984; 32: 95-99.

- BIBLIOGRAFIA -

335. Chamberlain P, Compston J, Cox TM, Hayman AR, Imrie RC, Reynolds K, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies to human type-5 tartrate-resistant acid phosphatase: development of a specific immuno-assay of the isoenzyme in serum. *Clin Chem* 1995; 41: 1495-1499.
336. Schindelmeiser J, Radzun HJ, Munstermann D. Tartrate resistant purple acid phosphatase in Gaucher cells of the spleen. Immuno- and cytochemical analysis. *Pathol Res Pract* 1991; 187: 209-213.
337. Flach J, Pilet PE, Jolles P. What's new in chitinase research? *Experientia* 1992; 48: 701-716.
338. Raghavan N, Freedman DO, Fitzgerald PC, Unnasch TR, Ottesen EA, Nutman TB. Cloning and characterization of a potentially protective chitinase-like recombinant antigen from *Wuchereria bancrofti*. *Infect Immun* 1994; 62: 1901-1908.
339. Huber M, Cabib E, Miller LH. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2807-2810.
340. Hollak CEM, van Weely S, van Oers MHJ, Aerts J. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994; 93: 1288-1292.
341. Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts J. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem* 1995; 270: 2198-2202.
342. Giraldo P, Cenarro A, Alfonso P, Pérez-Calvo JI, Rubio-Félix, Giralto M, et al. Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients with type 1 Gaucher's disease and their relatives (carriers and non-carriers). *Haematologica* 2001; 86: 977-984.
343. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Blik J, de Meulemeester TM, et al. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 1998; 273: 25680-25686.
344. Guo Y, He W, Boer AM, Wevers RA, Bruijn AM, Groener JEM, et al. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis* 1995; 18: 717-722.
345. Barone R, Di Gregorio F, Romeo MA, Schiliró G, Pavone L. Plasma chitotriosidase activity in patients with β -thalassemia. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25: 1-8.
346. Czartoryska B, Tylki-Szymanska A, Górska D. Serum chitotriosidase activity in Gaucher patients on enzyme replacement therapy (ERT). *Clin Biochem* 1998; 31: 417-420.
347. Czartoryska B, Tylki-Szymanska A, Lugowska A. Changes in serum chitotriosidase activity with cessation of replacement enzyme (Cerebrosidase) administration in Gaucher disease. *Clin Biochem* 2000; 33: 147-149.

- BIBLIOGRAFIA -

348. Young E, Chatterton, Vellodi A, Winchester B. Plasma chitotriosidase activity in Gaucher disease patients who have been treated either by bone marrow transplantation or by enzyme replacement therapy with alglucerase. *J Inher Metab Dis* 1997; 595-602.
349. Giralt M, Alvarez R. Aspectos morfológicos. En: *Enfermedad de Gaucher*. Giraldo P, Giralt M, Pocovi M, Pérez-Calvo JI (eds). RS editorial. Zaragoza, 1999. Pag 93-99.
350. Sloan HR, Breslow JL. Foam cells. En: *Nathan DG, Oski FA (eds). Hematology of Infancy and childhood*. Filadelfia Saunders 1974; pag. 760-773.
351. Fernández Cavada JL, Figueras MJ. Células de Gaucher en la leucemia granulocítica crónica. *Sangre* 1972; 17: 211-215.
352. Kelsez PR, Geany CG. Sea-blue histiocyte and Gaucher cells in bone marrow of patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Pathol* 1988; 41: 960-962.
353. Taino EC, Rossi MB, Pham TD, Azar HA. Gaucher's cells in thalassemia. *Blood* 1971; 38: 457-462.
354. Van Dorpe A, Boveckaert-van Orshoven A, Desmet V, Verwilghen RL. Gaucher-like cells and dyserythropoietic anemia type II (HEMPAS). *Br J Haematol* 1973; 25: 165-170.
355. Djaldelti M, Fishman P, Bessler H. The surface ultrastructure of Gaucher cells. *Am J Clin Pathol* 1979; 71: 146-150.
356. Lee RE. The pathology of Gaucher disease. *Prog Clin Biol Res* 1982; 95: 177-217.
357. Pastores GM. Pathological features. *Baillières Clin Haematol* 1997; 10: 739-749.
358. Cadaval RL, Gonzalez-Cámpora R, Davidson HG, Vicente AM. Cirrosis hepática en la enfermedad de Gaucher. *Gastroenterol Hepatol* 1983; 6: 299-301.
359. Edwards WD, Hurdey HPD, Partin JR. Cardiac involvement by Gaucher's disease documented by right ventricular endomyocardial biopsy. *Am J Cardiol* 1983; 52: 654.
360. Rosenmann E, Aviram A. Glomerular involvement in storage diseases. *J Pathol* 1972; 111: 61-64.
361. Zidar BL, Hartsock RJ, Lee RE, Glew RH, LaMarco KL, Pugh RP, et al. Pseudo-Gaucher cells in the bone marrow of a patient with Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 1987; 533-536.
362. Solis OG, Belmonte AH, Ramaswamy G, Tchertkoff V. Pseudo-Gaucher cells in *Mycobacterium avium* intracellulare infections in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Am J Clin Pathol* 1986; 85: 233-235.
363. Beutler E, Saven A. Misuse of marrow examination in the diagnosis of Gaucher's disease. *Blood* 1990; 76: 646-648.

- BIBLIOGRAFIA -

364. Beutler E, Kuhl W, Trinidad F, Teplitz R, Nadler H. Beta-glucosidase activity in fibroblasts from homozygotes and heterozygotes for Gaucher's disease. *Am J Hum Genet* 1971; 23: 62-66.
365. Hultberg B, Sjoblad S, Öcherman PA. 4-Methylumbelliferyl-beta-glucoside in cultured human fibroblasts from controls and patients with Gaucher's disease. *Clin Chim Acta* 1973; 49: 93-97.
366. Beutler E, Kuhl W. Detection of the defect of Gaucher's disease and its carrier state in peripheral-blood leukocytes. *Lancet* 1970; 1: 612-613.
367. Peters SP, Lee RE, Glew RH. A microassay for Gaucher's disease. *Clin Chim Acta* 1975; 60: 391-396.
368. Beutler E, Kuhl W, Sorge J. Cross-reacting material in Gaucher disease fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 6506-6510.
369. Grabowski GA. Gaucher disease: considerations in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2000; 20: 60-62.
370. Sprangler RS. Cyclooxygenase 1 and 2 in rheumatic disease: implications for nonsteroidal antiinflammatory drug therapy. *Semin Arthr Rheumatol* 1996; 26: 435-446.
371. Cohen IJ, Kornreich L, Medhamandarov S, Katz K, Zaizov R. Effective treatment of painful bone crisis in type I Gaucher's disease with high dose prednisolone. *Arch Dis Child* 1996; 75: 218-222.
372. Cohen IJ, Kornreich L, Bar Sever T, Yaniv Y. Oral high dose methyl prednisolone treatment for bone crisis in type I Gaucher disease: six years, no side effects. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 13.
373. Elstein D, Itzhaki M, Mankin H. Skeletal involvement in Gaucher's disease. *Baillières Clin Haematol* 1997; 10: 793-816.
374. Fleisch H. Biphosphonates: pharmacology and use in the treatment of tumor-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs* 1991; 42: 919-944.
375. Harinck HIJ, Bijvoet OLM, van der Meer JWH, Jones B, Onvlee GJ. Regression of bone lesions in Gaucher's disease during treatment with aminohydroxypropylidene bisphosphonate. *Lancet* 1984; 1: 513.
376. Samuel R, Katz K, Papapoulos S, Yosipovitch Z, Zaizov R, Liberman UA. Aminohydroxypropylidene bisphosphonate (APD) treatment improves the clinical skeletal manifestations of Gaucher's disease. *Pediatrics* 1994; 94: 385-389.
377. Bembi B, Agosti E, Boehm P, Nassimbeni G, Zanatta M, Vidoni L. Aminohydroxypropylidene-bisphosphonate in the treatment of bone lesions in a case of Gaucher's disease type 3. *Acta Paediatr* 1994; 83: 122-124.

- BIBLIOGRAFIA -

378. Wenstrup R, Grabowski GA, Williams L, Elstein D, Zimran A. A controlled trial of alendronate disodium in adults receiving enzyme replacement therapy for Gaucher disease. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 67.
379. Van Wellen PA, Haentjens Frecourt N, Opdecam P. Loosening of noncemented porous-coated anatomic femoral component in Gaucher's disease. A case report and review of the literature. *Acta Orthop Belg* 1994; 60: 119-123.
380. Alkali A, Kaufman T, Shazar Y. Bilateral total hip replacement in a young woman with Gaucher disease. *Harefuah* 1979; 96: 480-481.
381. Lachiewicz PF, Lane JM, Wilson PD. Total hip replacement in Gaucher's disease. *J Bone Joint Surg* 1981; 63A: 602-608.
382. Ruff ME, Weis LD, Kean JR. Acute kyphosis in Gaucher disease. *Spine* 1984; 9: 835-837.
383. Medoff AS, Bayrd ED. Gaucher's disease in 29 cases: hematologic complications and effect of splenectomy. *Ann Intern Med* 1954; 40: 481-492.
384. Fleshner PR, Aufses AH Jr, Grabowski GA, Elias R. A 27-year experience with splenectomy for Gaucher's disease. *Am J Surg* 1991; 161: 69-75.
385. Lester TJ, Grabowski GA, Goldblatt J, Leiderman IZ, Zaroulis CG. Immune thrombocytopenia and Gaucher's disease. *Am J Med* 1984; 77: 569-571.
386. Haratz D, Manny N, Raz L. Autoimmune hemolytic anemia in Gaucher's disease. *Klin Wochenschr* 1990; 68: 94-95.
387. Parker RL, Grewal RP, McKeown LP, Barton NW. Effect of platelet count on the DDAVP induced shortening of the bleeding time in thrombocytopenic Gaucher's patients. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992; 14: 39-43.
388. Friedman BA, Vaddi K, Preston C, Mahon E, Cataldo JR, McPherson JM. A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived β -glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease. *Blood* 1999; 93: 2807-2816.
389. Duursma SA, Aerts JMFG, Belmatoug N, Cox T, Einhorn A, Esplin JA, et al. Management of Gaucher disease. Current status and future directions: a round-table discussion. *Semin Hematol* 1995; 32, Suppl 1: 45-52.
390. Beutler E. Economic malpractice in treatment of Gaucher's disease. *Am J Med* 1994; 97: 1-2.
391. Beutler E, Kay AC, Saven A, Hibbert SR, Dekaban AS. Enzyme-replacement therapy for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1991; 325: 1809-1810.

392. Figueroa ML, Rosenbloom BE, Kay AC, Garver P, Thurston DW, Koziol JA, et al. A less costly regimen of alglucerase to treat Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1992; 327: 1632-1636.
393. Barton NW, Brady RO, Murray GJ, Argoff Ch E, Grewal RP, Kian-Ti Y, et al. Enzyme replacement therapy for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1991; 325: 1811.
394. Pastores GM, Sibille AR, Grabowski GA. Enzyme therapy in Gaucher disease type 1: dosage efficacy and adverse effects in thirty-three patients treated for six to twenty-four months. *Blood* 1993; 82: 408-416.
395. Sato Y, Beutler E. Binding, internalization and degradation of mannose-terminated glucocerebrosidase by macrophages. *J Clin Invest* 1993; 91: 1909-1917.
396. Mistry PK, Wraight EP, Cox T. Therapeutic delivery of proteins to macrophages: implications for treatment of Gaucher's disease. *Lancet* 1996; 348: 1555-1559.
397. Beutler E, Demina A, Laubscher K, Garver P, Gelbart T, Balicki D, et al. The clinical course of treated and untreated Gaucher disease. A study of 45 patients. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21: 86-108.
398. Beutler E. Modern diagnosis and treatment of Gaucher's disease. *Am J Dis Child* 1993; 147: 1175-1183.
399. Hollak C, Maas M, van Weely S, Aerts H, Maaswinkel P, Phoa S, et al. Enzyme therapy for Gaucher's disease: long-term efficacy of individualized doses in adult patients. 3rd Workshop of the European Working Group on Gaucher disease. Lemnos, May 20-23, 1999.
400. Pérez Calvo JI, Giraldo P. Tratamiento de la enfermedad de Gaucher tipo 1. Mucho camino aún por recorrer. *Med Clin (Barc)* 2000; 114: 774-776.
401. Altarescu G, Schiffmann R, Parker CC, Moore DF, Kreps C, Brady RO, et al. Comparative efficacy of dose regimens in enzyme replacement therapy of type I Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26: 303-306.
402. Zimran A, Hollak CEM, Abrahamov A, van Oers MHJ, Kelly M, Beutler E. Home treatment with intravenous enzyme replacement therapy for Gaucher disease: an international collaborative study of 33 patients. *Blood* 1993; 82: 1107-1109.
403. Ida H, Rennert O, Kobayashi M, Eto Y. Effects of enzyme replacement therapy in thirteen Japanese paediatric patients with Gaucher disease. *Eur J Pediatr* 2001; 160: 21-25.
404. Elstein D, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Zimran A. Withdrawal of enzyme replacement therapy in Gaucher's disease. *Br J Haematol* 2000; 110: 488-492.
405. Zimran A, Elstein D, Kannai R, Zevin S, Hadas-Halpern L, Levy-Lahad E, et al. Low dose replacement therapy for Gaucher's disease: effects of age, sex, genotype and clinical features on response to treatment. *Am J Med* 1994; 97: 3-13.

- BIBLIOGRAFIA -

406. Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, Dambrosia JM, Banerjee TK, McKee MA, et al. Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann Intern Med* 1995; 32, Suppl 1: 28-32.
407. Hollak CEM, Aerts JMFG, Goudsmit R, Phoa SSS, Ek M, van Weely S, et al. Individualised low-dose alglucerase therapy for type 1 Gaucher's disease. *Lancet* 1995; 345: 1474-1478.
408. Zimran A, Elstein D, Levy-Lahad E, Zevin S, Hadas-Halpern L, Bar-Ziv Y, et al. Replacement therapy with imiglucerase for type 1 Gaucher's disease. *Lancet* 1995; 345: 1479-1480.
409. Hollak CE, Corssmit EPM, Aerts JMFG, Endert E, Sauerwein HP, Romijn JA, et al. Differential effects of enzyme supplementation therapy on manifestations of type 1 Gaucher disease. *Am J Med* 1997; 103: 185-191.
410. Pérez-Calvo JI, Giraldo P, Giralto M. Tratamiento con alglucerasa de la enfermedad de Gaucher tipo I. Resultados preliminares en España. *Sangre* 1997; 42: 189-194.
411. Beutler E. Enzyme replacement therapy for Gaucher's disease. *Ballière Clin Haematol* 1997; 10: 751-763.
412. Rosenthal DI, Doppelt SH, Mankin HJ, Dambrosia JM, Xavier RJ, McKusick KA, et al. Enzyme replacement therapy for Gaucher disease: skeletal responses to macrophage-targeted glucocerebrosidase. *Pediatrics* 1995; 96: 629-637.
413. Hill SC, Parker C, Brady RO, Barton NW. MRI of multiple platyspondyly in Gaucher disease: Response to enzyme replacement therapy. *J Comput Assist Tomogr* 1993; 17: 806-809.
414. Barton NW, Brady RO. Gaucher disease: Skeletal responses to enzyme replacement therapy. *Gaucher Clin Perspect* 1994; 2: 8-11.
415. Zimran A, Elstein D, Abrahamov, Itzhaki M. Low-dose high-frequency enzyme replacement therapy prevents fractures without complete suppression of painful bone crises in patients with severe juvenile onset type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24: 303-305.
416. Terk MR, Dardashti S, Liebman HA. Bone marrow response in treated patients with Gaucher disease: evaluation by T1-weighted magnetic resonance images and correlation with reduction in liver and spleen volume. *Skeletal Radiol* 2000; 29: 563-571.
417. Bembi B, Ciana G, Zanatta M. Cerebrospinal fluid infusion of alglucerase in the treatment of acute neuronopathic Gaucher's disease. *Pediatr Res* 1995; 38: 425.
418. Schiffmann R, Heyers MP, Aerts JM, Dambrosia JM, Patterson MC, DeGabra T, et al. Prospective study of neurological responses to treatment with macrophage-

- BIBLIOGRAFIA -

targeted glucocerebrosidase in patients with type 3 Gaucher's disease. *Ann Neurol* 1997; 42: 613-621.

419. Altarescu G, Hill S, Wiggs E, Jeffries N, Kreps C, Parker CC, et al. The efficacy of enzyme replacement therapy in patients with chronic neuronopathic Gaucher's disease. *J Pediatr* 2001; 138: 539-547.

420. Rolfs A. High dosage enzyme replacement therapy in chronic neuronopathic Gaucher patients is efficient to stop progression of the neurological symptoms. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 50.

421. Edelman M, Mengel E, Ries M, Sextro K, Sextro A, Rolfs A, et al. Clinical manifestations and high-dose enzyme-replacement therapy (ERT) in neuronopathic Gaucher disease. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 17.

422. Rubio-Félix D, Giraldo P, Pérez-Calvo JI, Rite S, Giralto M. Quality of life in type 1 Gaucher disease patients under ERT: Influence of bone involvement. The 4th Meeting of the European Working Group on Gaucher Disease (EWGGD). Jerusalem, September 6-9, 2000. Abstract Book; p. 53.

423. Ponce E, Moskovitz J, Grabowski G. Enzyme therapy in Gaucher disease type 1: Effect of neutralizing antibodies to acid β -glucosidase. *Blood* 1997; 90: 43-48.

424. Rosemberg M, Kingma W, Fitzpatrick MA, Richards SM. Immunosurveillance of alglucerase enzyme therapy for Gaucher patients: Induction of humoral tolerance in seroconverted patients after repeat administration. *Blood* 1999; 93: 2081-2088.

425. Aviner S, Levy I, Yaniv Y, Cohen IJ. Anaphylactoid reaction to imiglucerase, but not to alglucerase, in a type 1 Gaucher patient. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25: 92-94.

426. Inokuchi J, Radin NS. Preparation of the active isomer of 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol inhibitor of murine glucocerebrosidase synthetase. *J Lipid Chem* 1987; 28: 565-571.

427. Mistry PK. Treatment of Gaucher's disease with OGT 918. *Lancet* 2000; 356: 676.

428. Barranger JA. Risks of Gaucher's treatment. *Lancet* 2000; 356: 1353.

429. Pérez-Calvo JI, Pastores GM, Isola L, Giraldo P, Bueno Gómez J. Enfoque terapéutico actual de la enfermedad de Gaucher tipo 1. *Sangre* 1994; 39: 39-44.

430. Hoogerbrugge PM, Valerio D. Bone marrow transplantation and gene therapy for lysosomal storage diseases. *Bone marrow transplant* 1998; 21 (Suppl): 34-36.

431. Rubio-Félix D. Transplante de precursores hematopoyéticos. En: *Enfermedad de Gaucher*. Giraldo P, Giralto M, Pocovi M, Pérez-Calvo JI (eds). RS editorial. Zaragoza, 1999. Pag 181-189.

- BIBLIOGRAFIA -

432. Ringden O, Groth CG, Erikson A, Bäckman L, Granqvist S, Mansson JE, et al. Long term follow-up of the first successful bone marrow transplantation in Gaucher disease. *Transplantation* 1988; 46: 66-70.
433. Hoogerbrugge PM, Brouwer OF, Bordignon P, Ringden O, Kapaun P, Ortega JJ, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. *Lancet* 1995; 345: 1398-1402.
434. Ringden O, Groth CG, Erikson A, Granqvist S, Mansson Je, Sparrelid E. Ten years experience of bone marrow transplantation for Gaucher disease. *Transplantation* 1995; 59: 864-870.
435. Vellodi A, Camba L, McCarthy D. Bone marrow transplantation for inborn errors of metabolism. En Treleaven J, Barret J (eds). *Bone marrow transplantation in practice*. Edimburgo, Churchill Livingstone 1992: 161-176.
436. Sly WS. Receptor-mediated transport of acid hydrolases to lysosomes. *Curr Top Cell Regul* 1985; 26: 27-38.
437. Moullier P, Bohl D, Heard JM, Danos O. Corection of lysosomal storage in the liver and spleen of MPS VII mice by implantation of genetically modified skin fibroblasts. *Nat Genet* 1993; 4: 154-159.
438. Fairbairn LJ, Lashford LS, Spoonrer E, McDermott RH, Lebens G, Arrand JE, et al. Long-term in vitro correction of alpha-L-iduronidase deficiency (Hurler syndrome) in human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2025-2030.
439. Naffakh N, Pinset C, Montarras D, Li Z, Paulin D, Danos O, et al. Long-term secretion of therapeutic proteins from genetically modified skeletal muscles. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 11-21.
440. Snyder EY, Taylor RM, Wolfe JH. Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature* 1995; 374: 367-370.
441. Nimgaonkar MT, Bahnson AB, Boggs SS, Ball ED, Barranger JA. Transduction of mobilized peripheral blood CD34+ cells with the glucocerebrosidase cDNA. *Gene Ther* 1994; 1: 201-207.
442. Dunbar C, Kohn D. Retroviral mediated transfer of the cDNA for human glucocerebrosidase into hematopoietic stem cells of patients with Gaucher disease. A phase I study. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 231-253.
443. Novo J. Terapia génica de las enfermedades lisosomales. En: *Enfermedad de Gaucher*. Giraldo P, Giralt M, Pocovi M, Pérez-Calvo JI (eds). RS editorial. Zaragoza, 1999. Pag 191-198.
444. Beutler E. Gaucher disease asa a paradigm o current issues regarding single gene mutations of humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5384-5390.

- BIBLIOGRAFIA -

445. Erikson A. Gaucher disease: Norrbottnian type 3. Neuropathological aspects of clinical patterns and treatment. *Acta Paediatr Scand* 1986; 326: 1-42.
446. Platt FM, Neises GR, Reinkensmeier G, Townsend MJ, Perry VH, Proia RL, et al. Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Science* 1997; 276: 428-431.
447. Miller S, Dykes D, Polensky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
448. Beutler E, Gelbart T, West C. The facile detection of the nt 1226 mutation of glucocerebrosidase by mismatched PCR. *Clin Chim Acta* 1990; 194: 161-166.
449. Laubscher KH, Glew RH, Lee RE, Okinaka RT. Use of denaturing gradient gel electrophoresis to identify mutant sequences in the beta-glucocerebrosidase gene. *Hum Mutat* 1994; 3: 411-415.
450. Beutler E, Gelbart T. Erroneous assignment of Gaucher disease genotype as consequence of gene deletion. *Hum Mutat* 1994; 4: 212-226.
451. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-2770.
452. Sanger F, Coulson AR. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Letter* 1978; 87: 107-110.
453. Miles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP, Cook JD. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Analyt Biochem* 1974; 61: 209-224.
454. Juul A, Moller S, Mosfeldt-Laursen E, Rasmussen MH, Scheike T, Pedersen SA, et al. The acid-labile subunit of human ternary insulin-like growth factor binding protein complex in serum: hepatosplanchnic release, diurnal variation, circulating concentrations in healthy subjects, and diagnostic use in patients with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4408-4415.
455. Deininger MW, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 2000; 60: 2049-2055.
456. Greiner J, Ringhoffer M, Simikopinko O, Szmargowska A, Huebseh S, Mauner A, et al. Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2000; 29: 1413-1422.
457. Dales JP, Plumas J, Palmerini F, Devilard E, Defrance T, Lajunrenovich A, et al. Correlation between apoptosis microarray gene expression profiling and histopathological lymph node lesions. *Mol Pathol* 2001; 54: 17-23.

- BIBLIOGRAFIA -

458. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-511.
459. Mensen HD, Schmidt A, Bartelt S, Arjomand A, Thomsen H, Leben R, et al. *Leuk Lymphoma* 2000; 36: 285-294.
460. Pozo J, Gracia R, Argente J. Hipocrecimiento: Concepto y clasificación. En: *Tratado de Endocrinología pediátrica y del Adolescente*. Argente J, Carrascosa A, Gracia R, Rodríguez F (eds). EDIMSA. Madrid, 1995. Pag 95-110.
461. Gluckman PD, Douglas RG, Ambler GR, Breier BH, Hodgkinson SC, Koena JB, Shaw JHF. The endocrine role of insulin-like growth factor I. *Acta Paediatr Scand* 1991; 372 (suppl):97-105.
462. Welle S. Growth hormone and insulin-like growth factor I as anabolic agents. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998; 1: 257-62.
463. Salmon Jr WD, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation buy cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 1957; 49: 825.
464. Rinderknecht E, Humbel RE. The aminoacid sequence of human insulin-like growth factor –I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978; 253: 2769.
465. Rinderknecht E, Humbel RE. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 1978; 89: 283.
466. Cohen P, Rosenfeld RG. Physiologic and clinical relevance of the insulin-like growth factor binding proteins. *Curr Opin Pediatr* 1994; 6: 462-467.
467. Le Roith DL. Insulin-like growth factors. *New Engl J Med* 1997; 336: 633-640.
468. Neely EK, Beukers MW, Oh Y, Cohen P, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors receptors. *Acta Paediatr Scand* 1991; 372 (suppl): 116-123.
469. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34.
470. Labarta JI, Mayayo E, Ferrandez A. Factores de crecimiento similares a la insulina y sus proteínas transportadoras: ¿Qué son y para qué sirven?. *Bol Pediatr Arag Rioj Sor* 1998; 28: 53-61.
471. Blum WF, Albertsson Wilkand K, Rosberg S, Ranke MB. Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1610-1616.
472. Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Gaugel E, Zeisel HJ, Bierich JR. A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding

- BIBLIOGRAFIA -

protein: its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 1292-1298.

473. Blum WF. Factores de crecimiento similares a la insulina y sus proteínas fijadoras. En: Ranke MB. Diagnóstico endocrinológico funcional en niños y adolescentes. Ed: Díaz de Santos, Madrid. 1993; 117-133.

474. Holt RI, Jones JS, Stone NM, Baker AJ, Miell JP. Sequential changes in insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children with end-stage liver disease before and after successful orthotopic liver transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 160-168.

475. Argente J, Barrios V, Pozo J, Muñoz MT, Hervas F, Stene M, et al. Normative data for insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins, and growth hormone-binding protein in a healthy spanish pediatric population: age- and sex- related changes. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1522-1528.

476. Juul A, Dalgaard P, Blum WF, Bang P, Hall K, Michaelsen KF, et al. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children and adolescents: the relation to IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and puberal maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2534-2542.

477. Ooi GT. Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): more than just 1, 2, 3. *Mol Cel Endocrinol* 1990; 71: C39-C41.

478. Baxter RC. The binding protein's binding protein-clinical applications of the acid labile subunit (ALS) measurements. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3941-3943.

479. Khosravi MJ, Diamandi A, Mistry J, Krishna RG, Khare A. Acid-labile subunit of human insulin-like growth factor binding protein complex: measurement, molecular and clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3944-3951.

480. Labarta JI, Gargosky SE, Simpson DM, Lee PDK, Argente J, Guevera J, Rosenfeld RG. Immunoblot studies of the acid labile subunit (ALS) in biological fluids, normal human serum and in children with GH deficiency and GH receptor deficiency before and after long term therapy with GH or IGF-1 respectively. *Clin Endocrinol* 1997; 47: 657-666.

481. Mandel SH, Moreland E, Rosenfeld RG, Gargosky SE. The effect of GH therapy on the immunoreactive forms and distribution of IGFBP-3, IGF-I, the acid-labile subunit, and growth rate in GH-deficient children. *Endocrine* 1997; 7: 351-60.

482. Ormarsdottir S, Ljunggren O, Mallmin H, Olofsson H, Blum WF, Loof L. Circulating levels of insulin-like growth factors and their binding proteins in patients with chronic liver disease: lack of correlation with bone mineral density. *Liver* 2001; 21: 123-128.

483. Bengtsson BA, Abs R, Bennmarker H, Monson JP, Feldt-Rasmussen U, Hernberg-Stahl E, Westberg B, Wilton P, Wuster C. The effects of treatment and the individual

- BIBLIOGRAFIA -

responsiveness to growth hormone (GH) replacement therapy in 665 GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3929-35.

484. Seck T, Scheidt-Nave C, Leidig-Bruckner G, Ziegler R, Pfeilschifter J. Low serum concentrations of insulin-like growth factor I are associated with femoral bone loss in a population-based sample of postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 55: 101-106.

485. Blahovec J, Kostecka Z, Iacox MC, Cabanie L, Godeau F, Mester J, et al. Mitogenic activity of high molecular weight forms of insulin-like growth factor-II in amniotic fluid. *J Endocrinol* 2001; 169: 563-572.

486. Schneid H, Le Bouc Y. Insulin-like growth factor-II and growth. *Growth Genet Horm* 1994; 10: 1-4.

487. Gluckman PD, Ambler GR. What is the function of circulating insulin-like growth factor binding protein-2 in postnatal life?. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 92: C1-C3.

488. Kveiborg M, Flyvbjerg A, Eriksen EF, Kassem M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the production of insulin-like growth factor-binding proteins-2, -3 and -4 in human bone marrow stromal cells. *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 549-557.

489. Van Doorn J, Cornelissen AJ, Van Buul-Offers SC. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 54: 655-664.

490. Ozawa K, Kondo T, Hori O, Kitao Y, Stern DM, Eisenmenger W, et al. Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J Clin Invest* 2001; 108: 39-40.

491. Ozawa K, Tsukamoto Y, Hori O, Kitao Y, Yanagi H, Stern DM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by oxygen-regulated protein 150, and inducible endoplasmic reticulum chaperone. *Cancer Res* 2001; 61: 4206-4213.

492. Kimura S, Donovan JC, Nebert DW. Expression of the mouse P(1)450 gene during differentiation without foreign chemical stimulation. *J Exp Pathol* 1987; 3: 61-74.

493. Chen YM, Chen LY, Wong FH, Lee CM, Chang TJ, Yang-Feng TL. Genomic structure, expression, and chromosomal localization of the human glycine N-methyltransferase gene. *Genomics* 2000; 66: 43-47.

494. Aida K, Tawata M, Negishi M, Onaya T. Mouse glycine N-methyltransferase is sexually dimorphic and regulated by growth hormone. *Horm Metab Res* 1997; 29: 646-649.

495. Eui-Ju Y, Wagner C. Tissue distribution of glycine N-methyltransferase, a major folate-binding protein of liver. *Biochemistry* 1994; 91: 210-214.

496. Boot RG, van Achtenberg TA, van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJ, Aerts JM, et al. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis:

- BIBLIOGRAFIA -

chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 687-694.

497. De Ceuninck F, Gauffillier S, Bonnaud A, Sabatini M, Lesur C, Pastoureau P. YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 926-931.

498. Vos K, Steenbakkers P, Miltenburg AM, Bos E, van Den Heuvel MW, van Hogezaand RA, et al. Raised human cartilage glycoprotein-39 plasma levels in patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions.

499. Philip A, Bostedt L, Stigbrand T, O'Connor-McCourt MD. Binding of transforming growth factor-beta to pregnancy zone protein (PZP). Comparison to the TGF-beta-alpha 2-macroglobulin interaction. *Eur J Biochem* 1994; 221: 687-693.

500. Devriendt K, Massa G, de Zegher F, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Cassiman JJ, Van den Berghe H, et al. Opposite effects of growth hormone and estrogens on the pregnancy zone protein serum levels in children and adolescents. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993; 128: 334-338.

501. Mitra P, Vaughan PS, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ. Purification and functional analysis of a novel leucine-zipper / nucleotide-fold protein, BZAP45, stimulating cell cycle regulated histone H4 gene transcription. *Biochemistry* 2001; 40: 10693-10699.

502. Haskill S, Peace A, Morris J, Sporn SA, Anisowicz A, Lee SW, et al. Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87: 7732-7736.

TABLAS

Tabla 1. Momentos históricos más destacados en la EG.

Tabla 2. Mutaciones que dan lugar al cambio de un aminoácido.

Tabla 3. Mutaciones que producen un codón de parada.

Tabla 4. Mutaciones que dan lugar a un cambio en la pauta de lectura, afectan al ajuste, deleciones o inserciones.

Tabla 5. Reorganizaciones genéticas causantes de la enfermedad de Gaucher.

Tabla 6. Frecuencia de las mutaciones del GBA en pacientes españoles.

Tabla 7. Interacción entre los diferentes tipos de mutaciones en la EG.

Tabla 8. Mutaciones del gen de la Glucocerebrosidasa. Alelos nulos.

Tabla 9. Mutaciones del gen de la Glucocerebrosidasa. Alelos graves.

Tabla 10. Mutaciones del gen de la Glucocerebrosidasa. Alelos leves.

Tabla 11. Subtipos clínicos en la Enfermedad de Gaucher.

Tabla 12. Severity score index age adjusted (SSIA).

Tabla 13. Indicaciones del TES.

Tabla 14. Respuesta al TES al año de inicio de tratamiento.

Tabla 14. IGF-1 total. Valores de normalidad 0-7 años.

Tabla 15. IGF-1 total. Valores de normalidad. Varones.

Tabla 16. IGF-1 total. Valores de normalidad. Mujeres.

Tabla 17. IGFBP-3. Valores de normalidad 0-7 años.

Tabla 18. IGFBP-3. Valores de normalidad. Varones.

Tabla 19. IGFBP-3. Valores de normalidad. Mujeres.

Tabla 20. IGF-1 libre. Valores de normalidad.

Tabla 21. Características de los pacientes esplenectomizados.

Tabla 22. Coeficientes de correlación para Z-score talla.

- TABLAS -

Tabla 23. Parámetros hematológicos y bioquímicos.

Tabla 24. Perfil lipídico en individuos afectados de EG.

Tabla 25. Perfil lipídico en familiares sanos.

Tabla 26. Estudio de correlación de la actividad de quitotriosidasa.

Tabla 27. Variables clínicas de los pacientes en los que se analizó el sistema IGF.

Tabla 28. Variables analíticas de los pacientes en los que se analizó el sistema IGF.

Tabla 29. Frecuencia alélica de los pacientes en los que se analizó el sistema IGF.

Tabla 30. Correlaciones del eje IGF antes del TES.

Tabla 31. Grados de gravedad según SSIA.

Tabla 32. Genotipos en EG de diagnóstico en edad pediátrica.

Tabla 33. Frecuencia alélica.

Tabla 34. Características clínicas en relación al genotipo.

Tabla 35. Respuesta en el tamaño hepático.

Tabla 36. Respuesta en el tamaño esplénico.

Tabla 37. Respuesta en pacientes con niveles de hemoglobina < 11 g/dL.

Tabla 38. Respuesta en pacientes con recuentos plaquetarios $< 100 \times 10^9/L$.

Tabla 39. Colesterol total durante el TES.

Tabla 40. HDL colesterol e IA durante el TES.

Tabla 41. Respuesta en los niveles de Fosfatasa ácida.

Tabla 42. Respuesta de la actividad de quitotriosidasa al TES.

Tabla 43. Cambios en eje IGF durante el TES.

FIGURAS

Figura 1. Glucosilceramida.

Figura 2. Ruta de degradación de glucoesfingolípidos complejos.

Figura 3. Sitio activo de la β -glucosidasa ácida.

Figura 4. Gen de la prosaposina.

Figura 5. Organización genómica en el cromosoma 1.

Figura 6. Estructura del gen y pseudogen de la glucocerebrosidasa.

Figura 7. Distribución geográfica de la población de Gaucher infantil (<14 años).

Figura 8. Distribución por grupos de edad.

Figura 9. Distribución por tipos de la EG.

Figura 10. Actividad de β -glucosidasa ácida.

Figura 11. Rectas de regresión lineal (QT – variables clínicas y analíticas).

Figura 12. Regresión lineal IGF-I e IGFBP-3 con la talla e IGF-I con SSIA.

Figura 13. Distribución por grupos de edad al inicio del TES.

Figura 14. Respuesta del tamaño hepático.

Figura 15. Respuesta del tamaño hepático durante el primer año de TES.

Figura 16. Respuesta del tamaño esplénico.

Figura 17. Respuesta del tamaño esplénico durante el primer año de TES.

Figura 18. Respuesta del Z-score de talla al TES.

Figura 19. Porcentaje de pacientes con niveles de hemoglobina < 11 g/dL.

Figura 20. Evolución de los niveles de hemoglobina durante el TES.

Figura 21. Evolución de los niveles de hemoglobina durante el primer año de TES.

Figura 22. Porcentaje de pacientes con recuento plaquetario < $100 \times 10^9/L$.

Figura 23. Evolución del recuento plaquetario durante el TES.

Figura 24. Evolución del recuento plaquetario durante el primer año de TES.

- FIGURAS -

Figura 25. Evolución del colesterol total durante el TES.

Figura 26. Evolución del HDL colesterol durante el TES.

Figura 27. Evolución del IA durante el TES.

Figura 28. Evolución de los niveles de fosfatasa ácida durante el TES.

Figura 29. Evolución de los niveles de fosfatas ácida durante el primer año de TES.

Figura 30. Evolución de la actividad de quitotriosidasa con y sin TES.

Figura 31. Cambios en el eje IGF durante el primer año de tratamiento.