

**Taula 4 :** (continuació) Mutacions en el SGSH cuasants de la MPS IIIA. Numeració dels aminoàcids i nucleòtids d'acord amb Yogalingam i Hopwood. (2001). En dates anteriors la numeració es correspon amb Scott i col. (1995). Ambdues mantenen una diferència de 12 pb.

CANVI	CDNA	EXÓ	EFFECTE	DETECCIÓ	REFERÈNCIA
<b>Mutacions sense sentit</b>					
<b>W210X</b>	629G>A	5	Terminació prematura	- <i>AvaII</i>	Weber i col. (1997)
<b>R233X</b>	697C>T	6	Terminació prematura	- <i>AvaI</i>	Beesley i col. (2000)
<b>Q365X</b>	1093C>T	8	Terminació prematura		Esposito i col. (2000)
<b>E369X</b>	1105G>T	8	Terminació prematura	+ <i>BfaI</i>	Beesley i col. (2000)

CANVI	EXÓ	EFFECTE	DETECCIÓ	REFERÈNCIA
<b>Insercions, delecions, <i>splicing</i></b>				
<b>c.154delG</b>	2	Canvi de pauta al codó 52, terminació prematura en posició 263	+ <i>AvaII</i>	Di Natale i col., 1998
<b>IVS2-2A&gt;G</b>		Destruïx l'acceptor d' <i>splicing</i> de l'exó 2. S'utilitza un lloc críptic d' <i>splicing</i> a l'exó 3, generant-se un transcrit en pauta sense 2aa (H84 i Q85)		Bunge i col., 1997
<b>c.375-376insG</b>	4	Canvi de pauta, terminació prematura en posició 134		Weber i col., 1997
<b>c.421-422ins18</b>	4	Duplicació de 6 aminoàcids en posició 138		Bunge i col., 1997
<b>c.1027-1028insC</b>	8	Canvi de pauta, terminació prematura en posició 500	- <i>BstXI</i>	Weber i col., 1997
<b>c.1028-1029insT</b>	8	Canvi de pauta, terminació prematura en posició 500		Esposito i col., 2000
<b>c.1079delC</b>	8	Canvi de pauta, terminació prematura en posició 411	+ <i>Tail</i>	Weber i col., 1997
<b>c.1081delG</b>	8	Canvi de pauta, terminació prematura en posició 411		Bunge i col., 1997
<b>c.1080-1081insG</b>	8	Canvi de pauta, terminació prematura en posició 500		Esposito i col., 2000
<b>c.1135delG</b>	8	Canvi de pauta, terminació prematura en posició 411		Weber i col., 1997
<b>c.1144-1145 insAGCGCC</b>	8	Inserció de Gln i Arg	+ <i>HaeII</i>	Beesley i col., 2000
<b>c.1152del</b>	8	Canvi de pauta, terminació prematura en posició 412		Wood i Thompson, 2000
<b>c.1172-1177 delACTTCA</b>	8	Del F392 i K393		Wood i Thompson, 2000
<b>c.1272-1282del</b>	8	Del d'1Int. Canvi de pauta, terminació prematura en posició 423	- <i>RsaI</i>	Scott i col., 1995
<b>c.1295-1303del</b>	8	Del R433, A434 i R435	- <i>BstUI</i>	Blanch i col., 1997 Weber i col., 1997
<b>c.1377-1378insC</b>	8	Canvi de pauta, terminació prematura en posició 500		Wood i Thompson, 2000

---

## 6- PREVENCIÓ GENÈTICA

### 6.1- DIAGNÒSTIC PRENATAL

El diagnòstic prenatal es pot realitzar per l'anàlisi enzimàtica directa durant el primer trimestre de l'embaràs, a partir de vellositats coriòniques (Kleijer i col., 1986) o per amniocentesi.

L'anàlisi molecular també pot ser útil, sobretot quan es coneixen les mutacions presents en la família que sol·licita el diagnòstic prenatal.

### 6.2- CONSELL GENÈTIC

El diagnòstic de portadors és un dels serveis més sol·licitats entre les famílies que tenen algun membre amb mucopolisacaridosi, després de la demanda d'una teràpia efectiva.

Fins el moment, es coneixen alguns genotips que semblen estar associats a una progressió més atenuada de la malaltia. Malgrat això, i degut a l'elevada heterogeneïtat al·lèlica, calen més estudis per determinar si es pot realment establir d'una relació causa-efecte o bé si el fons genètic de cada individu i/o alguns factors ambientals tenen algun efecte important sobre l'evolució de la malaltia.

---

## 7- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

Per la síndrome de Sanfilippo tipus A és difícil establir una correlació genotip-fenotip, degut a que els pacients presenten una clínica molt semblant no només entre ells sinó també en relació als pacients amb la síndrome de Sanfilippo tipus B, C i D.

En la població japonesa semblaria que predominen els pacients amb una clínica atenuada (Miyazaki i col., 2002), però fins el moment no es disposa d'un estudi exhaustiu de mutacions.

La manca d'estudis globals que permetin avaluar la clínica i la genètica de tots els pacients diagnosticats i la probabilitat de que alguns afectats per aquesta malaltia no arribin a ser diagnosticats, dificulta l'estudi de les possibles relacions genotip-fenotip.

Fins el moment, només ha estat possible determinar que existeixen unes poques mutacions que semblarien estar associades a fenotips més lleus o intermedis. En tots els casos es tractaria de mutacions de canvi de sentit, fet que fa pensar que aquestes proteïnes mutades podrien expressar certs nivells d'activitat sulfamidasa (Yogalingam i Hopwood, 2001).

## 8- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTANTS

Un dels primers passos cap a l'estudi d'una possible teràpia de reemplaçament enzimàtic ha estat l'expressió de la sulfamidasa recombinant (rhNS) en cèl·lules CHO-K1 (Bielicki i col., 1998). Aquests primers estudis van permetre la purificació de la proteïna recombinant i l'estudi dels seus paràmetres cinètics. Comparant aquest paràmetres amb els que presenta la proteïna nativa estableixen que les seves propietats físiques i cinètiques són equivalents. Determinen també, que la sulfamidasa recombinant afegida a un cultiu de fibroblast de pacients amb MPS IIIA és capaç de disminuir els nivells d'HS de les cèl·lules i que la seva entrada es troba mediada per receptors de manosa 6-fosfat (per estudis de competició) (Bielicki i col., 1998).

Posteriorment han estat realitzats diversos estudis d'expressió per establir els nivells d'activitat que presenten diferents al·lels (Perkins i col., 1999; Daniele i Di Natale, 2001; Esposito i col., 2000; Di Natale i col., 2001). Esperàriem que mutacions en diferents punts del gen i, per tant, en diferents punts de la proteïna, provoquessin un efecte diferent, ja sigui en la transcripció, traducció, modificació post-traducciona, estabilitat, migració o processament de la proteïna. D'aquesta

manera, si coneixem quines mutacions són les que provoquen un efecte més dràstic sobre l'activitat de la proteïna sabem quines tenen un efecte més acusat sobre el fenotip.

### ***R74C (c.222C>T)***

Perkins i col·laboradors (1999) expressen i caracteritzen algunes de les mutacions responsables de la Síndrome de Sanfilippo A. Entre aquestes es troba la mutació més prevalent a Polònia i la segona més freqüent a Alemanya, la **R74C** (Bunge i col., 1997). Comporta el canvi d'un aminoàcid bàsic per un aminoàcid petit no polar que desestabilitzaria un pont d'hidrogen, el qual sembla ser crític per l'eliminació del grup éster sulfat de l'extrem no reduït del substrat (Bond i col., 1997).

És una de les posicions altament conservades entre les sulfatases ja que forma part de la primera regió consens descrita amb anterioritat. Per comparació de seqüència amb l'ARSB (N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa) (Bond i col., 1997), l'Arg74 estaria implicada en la formació i estabilització del lloc actiu.

L'expressió d'aquesta mutació *in vitro* (cèl·lules CHO-K1), revela que la quantitat de proteïna que s'obté respecte la quantitat de proteïna total es troba molt disminuïda (0,2 %) així com l'activitat específica (12 %), en relació als valors que s'obtenen per la proteïna salvatge. Es confirma així que el canvi de l'arginina 74 per una cisteïna afecta l'estabilitat de la proteïna (Perkins i col., 1999).

**S66W(c.197C>G)**

Una altra de les mutacions expressada per Perkins i col·laboradors (1999) és la **S66W**, la més freqüent en la població italiana (Di Natale i col., 1998). Aquest residu serina, a diferència de l'anterior, no es troba conservat entre la sulfamidasa i la ARSB, però es troba molt pròxim al motiu CSPSR (motiu de la primera regió consens). És per aquesta raó que s'hipotetitzava que el seu efecte podria ser degut a que el canvi d'una serina per un triptòfan interferiria en l'esfera de coordinació del residu cisteïna del motiu CSPSR (Bond i col., 1997).

El resultat que s'extreu de l'expressió d'aquesta mutació, és el mateix que en el cas anterior, on la quantitat i l'activitat de la proteïna es troben molt reduïdes (0,3 % i 15 %, respectivament), indicant que la mutació deu tenir algun efecte en l'estabilitat del lloc actiu (Perkins i col., 1999).

**R245H (c.734G>A)**

Una de les mutacions més estudiades per diferents grups degut a la seva elevada freqüència en alguns països és la **R245H** (Blanch i col., 1997; Weber i col., 1997; Weber i col., 1998; Perkins i col., 2001). A l'igual que la Ser66, l'Arg245 és un residu que no es troba conservat entre les sulfatases, però l'elevada prevalença d'aquesta mutació fa que el seu estudi sigui d'especial interès.

Per comparació de seqüència amb altres sulfatases es coneix que la regió C-terminal

d'aquestes proteïnes no es troba conservada, fent difícil hipotetitzar quin podria ser l'efecte de la mutació. Malgrat això, per comparació de seqüència amb ARSB i subsegüent superposició estructural, es dedueix que el residu Arg245 es trobaria proper a la superfície de l'hèlix  $\alpha$  de l'ARSB, i per tant es trobaria allunyada del centre actiu de la proteïna. Segons això, esperaríem que l'activitat específica de l'enzim no es veiés afectada, malgrat que la seva estabilitat sí que ho pogués estar, tal i com s'observa en els estudis d'expressió (Perkins i col., 1999) i en l'anàlisi de l'enzim en fibroblasts (Perkins i col., 2001), on no es detecten diferències en quant a la l'activitat específica de la proteïna mutada respecte la salvatge però sí en quant a la seva quantitat.

**ALTRES**

Han estat també expressades altres mutacions menys freqüents (**Y40N**, **A44T**, **166delG**, **G122R**, **P128L**, **L146P**, **R150Q**, **D179N**, **R182C**, **R206P**, **P227R**, **1040insT**, **1093insG**, **E369K**, **R377C**), donant com a resultat la manca d'activitat detectable en tots els casos (Esposito i col., 2000). Algunes d'aquestes mutacions (166delG, L146P, 1040insT i 1093insG) ocasionen canvis molt dràstics en l'estructura de la proteïna, donant com a resultat la manca de detecció de la proteïna madura i/o precursora en els anàlisis de *western blot*. En ocasions aquesta manca de detecció de la proteïna pot ser deguda a la manca de reconeixement per part de l'anticòs.

---

## 9- MODELS ANIMALS

Els models animals de les malalties hereditàries humanes resulten de gran utilitat per avaluar l'efectivitat de les aproximacions terapèutiques així com ampliar els coneixements disponibles sobre la patofisiologia de les malalties.

S'han descrit diferents models canins de la MPS IIIA (Fischer i col., 1998; Jolly i col., 2000). En un d'ells l'inici de la malaltia es manifestà al cap d'1 any i mig de vida amb atàxia severa (Jolly i col., 2000). En el segon, l'inici de la malaltia fou més tardà, cap a els 3 anys de vida, i la seva progressió més gradual (2 anys fins a desenvolupar una atàxia espino-cerebelar severa generalitzada).

La seqüència del DNA genòmic i del cDNA han estat publicades (Aronovich i col., 2000) (AF217203 i AF217204) i la detecció de mutacions en ambdós casos efectuada. En el primer, la inserció d'una adenina en la posició 708 del cDNA és la causant d'un canvi en la pauta de lectura i la terminació de la traducció en el codó 228. Mentre que en el segon, la mutació comporta la pèrdua d'un únic aminoàcid, una treonina en posició 246. La diferent naturalesa de les dues mutacions comporta la manca o l'existència d'una activitat sulfamidasa residual, respectivament, i com a conseqüència una diferent progressió i inici de la malaltia.

La MPS IIIA ha estat també identificada en ratolins, i la seqüència del gen identificada i mapada (Costanzi i col., 2000). La regió promotora ha estat també identificada i caracteritzada (Costanzi i col., 2003). S'han obtingut cèl·lules soca embrionàries (ES) per sobreexpressar la sulfamidasa humana recombinant i avaluar la possible efectivitat de la transferència gènica (ES cell-based therapy) per al tractament de la patologia neurològica de la MPS IIIA (Lau i col., 2004), amb resultats fins el moment prometedors.

---

## 10- TERÀPIA

### 10.1- TERÀPIA DE SUPORT

Fins el moment, i la espera del desenvolupament d'altres teràpies, l'única emprada actualment és la pal·liativa, ja sigui mèdica o quirúrgica. Els medicaments (com la *thioridazine*, la *trimeprazine* o el *valproate*, entre altres) tracten de reduir els problemes d'hiperactivitat, agitació i agressivitat que presenten els pacients en la segona etapa de la malaltia, però no són sempre suficients per alleugerar problemes més greus o episodis de crisis (Robertson i col., 1998). Una part important d'aquests problemes es creu que són

conseqüència de l'increment intermitent en la pressió intracranial, que es donaria com a resultat, no es coneix si directa o indirectament, de l'acumulació de mucopolisacàrids (Muezer, 1986; Walkley, 1995 i 1998).

## **10.2- TRANSPLANTAMENTS DE MEDUL·LA ÒSSIA**

El trasplantament de medul·la òssia ha estat provat en diversos pacients però generalment després de la presentació dels primers símptomes fet que dificulta la interpretació dels resultats obtinguts (Hoogerbrugge i col., 1995). Existeix almenys un cas en el qual el trasplantament ha estat realitzat abans de l'aparició dels símptomes (Sivakumur i Wraith, 1999). Després de mantenir un desenvolupament normal, amb uns nivells d'enzim similars als de la donant (la seva mare), no fou possible prevenir el deteriorament neurològic. El nen trasplantat a l'edat de 8 anys manifestava la mateixa simptomatologia que el seu germà no tractat (Sivakumur i Wraith, 1999). Aquests resultats posen en dubte el fet que aquest tipus de teràpia pugui ser eficient en pacients amb MPS IIIA que no han manifestat problemes neurològics.

## **10.3- REEMPLAÇAMENT ENZIMÀTIC**

La teràpia de reemplaçament enzimàtic actualment es troba disponible per un cert nombre de malalties d'acumulació lisosòmica (Gaucher, Fabry i MPS I) i en altres es troba en fase d'assatjos clínics (Pompe, MPS II i MPS VI) (revisat per Brooks i col., 2003). Malgrat aquests avenços, per al cas de la Síndrome de Sanfilippo tipus A no es disposa fins el moment del tractament enzimàtic ni es coneix si amb ell seria possible pal·liar els efectes que provoca l'acumulació dels GAGs sobre el sistema nerviós central, el més afectat. La dificultat més important en aquest sentit rau en travessar la barrera hematoencefàlica.

## **10.4- TRANSFERÈNCIA GÈNICA (cell-based therapy)**

El desenvolupament d'una teràpia efectiva pel tractament de la MPS IIIA ha de passar necessàriament pel desenvolupament de teràpies capaces de superar la barrera hematoencefàlica.

Recentment, ha estat assajada una teràpia basada en l'ús de cèl·lules ES murines que un cop modificades convenientment, expressen sulfamidasa humana i són capaces de mantenir aquesta expressió durant la diferenciació de les mateixes cap a cèl·lules neuronals (Lau i col., 2004).

Anteriorment, ja es coneixia que a partir de les cèl·lules ES era possible obtenir *in vitro* un ampli ventall de cèl·lules, entre les quals es troben les neurones (Bain i col., 1995). Es coneixia també, que la implantació al cervell de ratolins de cèl·lules modificades per a l'expressió d'un altre enzim lisosòmic, la  $\beta$ -glucuronidasa, permet l'alliberament de l'enzim recombinant i la seva captació per altres tipus cel·lular, gràcies a la presència de receptors manosa-6-fosfat (revisat a Lau i col., 2004). Veiem així, l'existència d'una petita escletxa d'esperança cap al desenvolupament d'una teràpia efectiva pel tractament de la MPS

IIIA basada en l'obtenció de cèl·lules ES que un cop modificades i diferenciades cap a neurones serien implantades al cervell dels pacients. Caldrà, però, aprofundir en l'estudi dels marcadors que determinen la correcta diferenciació de les cèl·lules ES cap a neurones. Així com, determinar l'abast i la seguretat d'aquesta teràpia. Queda, per tant, un llarg camí per arribar al desenvolupament d'una teràpia efectiva per la MPS IIIA així com per la resta de malalties d'acumulació lisosòmiques que afecten al sistema nerviós central.





---

# ***MALALTIA DE GAUCHER***

---



---

# 1- INTRODUCCIÓ

La primera descripció d'un pacient amb la que després s'anomenà malaltia de Gaucher va ser realitzada per Phillipe Ernest Gaucher a l'any 1882. En la seva tesi doctoral, va descriure una esplenomegàlia massiva en una dona de 32 anys com un neoplasma esplènic primari (Gaucher, 1882). Fou més tard, a l'any 1905, en que es corregí aquest error diagnòstic i es donà a aquesta afectació el nom de MALALTIA DE GAUCHER (Brill i col., 1905).

La malaltia de Gaucher és el trastorn d'acumulació lisosòmica més prevalent, causat per la deficiència en una hidrolasa lisosòmica, la  $\beta$ -D-glucosidasa àcida (anomenada també glucocerebrosidasa, ceramida  $\beta$ -glucosidasa o glucosilceramidasa) (Barranger i Ginns, 1989), com a resultat de mutacions en el gen que la codifica o, molt rarament, en el gen que codifica per una proteïna activadora necessària per al seu funcionament, la saposina C (SAP C). En ambdós casos es produeix, com a conseqüència, l'acumulació d'un substrat, el N-acil esfingosil-1-O-  $\beta$ -glucòsid (també anomenat glucosilceramida, ceramida  $\beta$ -glucòsid o glucocerebròsid) a l'interior dels lisosomes dels macròfags.

Existeixen diferents graus de severitat de la malaltia, originalment descrits per Knudson i Kaplan (1962), tenint en compte no només l'edat d'aparició de la malaltia sinó també el grau d'afectació del sistema nerviós central:

- Tipus I: no neuronopàtic (forma adulta)
- Tipus II: neuronopàtic agut (forma infantil)
- Tipus III: neuronopàtic subagut (forma juvenil)

Els nivells de glucosilceramida en pacients són de 2 a 20 vegades superiors que en individus sans, però aquests nivells no semblen estar en correlació amb el subtipus de la malaltia ni amb el nivell d'afectació que pugui existir dintre de cada subtipus (Dawson i col., 1977; Nilsson i col., 1982), almenys en les metodologies emprades per aquests autors.

La malaltia de Gaucher és especialment prevalent en la població jueva asquenazita on presenta una incidència de 1/400-1/600. En la població general aquesta incidència s'eleva fins a 1 de cada 40.000-60.000 (Grabowski, 1993).

Dintre de cada subtipus, així com dintre de cada grup ètnic i/o demogràfic, els fenotips i genotips poden ser marcadament heterogenis.

---

## 2- CLÍNICA

### 2.1- MANIFESTACIONS CLÍNIQUES

La deficiència en l'enzim glucocerebrosidasa (GBA) provoca l'acumulació de glucosilceramida de forma primària als lisosomes de cèl·lules del llinatge

monòcit/macròfag, incloent-hi els osteoclasts, les cèl·lules de Kuffer, els macròfags alveolars i probablement les cèl·lules microgials, induint una resposta inflamatòria. Això dona com a resultat una malaltia multisistèmica que inclou l'engrandiment progressiu de la melsa i el fetge, així com un reemplaçament gradual de la medul·la òssia per cèl·lules de Gaucher (veure apartat 3.1).

**MANIFESTACIONS ÒSSIES.** L'os és una de les estructures més afectades entre els pacients amb els tipus I i III de la malaltia de Gaucher (Charrow i col., 1998). Aquestes manifestacions inclouen l'osteoporosi, la necrosi vascular, particularment al cap del fèmur, i fractures patològiques. Una gran majoria dels pacients presenten deformacions esquelètiques greus als extrems distals dels fèmurs i proximals de les tíbies adoptant una forma anomenada de matràs d'Erlenmeyer (Pastores i Einhorn, 1995).

La severitat de les manifestacions òssies és molt variable, va des de la manca de símptomes fins a l'existència de pacients amb *crisis de dolor* associades a episodis de destrucció òssia. En alguns casos, la intensitat de la destrucció aconsella el tractament ortopèdic per a substituir o reconstruir caderes, genolls o espatlles.

Les manifestacions òssies provoquen problemes de mobilitat entre els pacients i, en alguns casos, són causants d'invalidesa.

**HEPATOESPLENOMEGÀLIA.** Gran part dels pacients presenten un engrandiment de la

melsa i el fetge (figura 9) que pot ser més o menys acusat segons l'individu. En ocasions es pot produir l'infart d'algunes zones de la melsa, manifestant-se febre, acidosi metabòlica i hiperuricèmia. L'engrandiment del fetge rarament provoca disfuncions hepàtiques i/o cirrosi. Les manifestacions hepàtiques són sempre evidents en biòpsies per la presència de cèl·lules Gaucher en els sinusoides hepàtics.



**Figura 9:** Nen amb la malaltia de Gaucher tipus I on és fa evident l'hepatoesplenomegàlia (imatge de Barranger Therapy review).

**ALTERACIONS HEMATOLÒGIQUES.** Els problemes hematològics són conseqüència d'un augment del segrestament de plaquetes a la melsa i la disminució de la producció degut al reemplaçament de les cèl·lules del moll de l'os per cèl·lules de Gaucher.

Es produeixen citopènies perifèriques que poden ser acusades. Les trombocitopènies són les més freqüents i més greus. Les leucopènies també estan presents en els pacients de la malaltia de Gaucher i, poden contribuir al desenvolupament d'infeccions recurrents, com

les produïdes pels virus Epstein-Bar (EBV) o per citomegalovirus (CMV). Aquestes infeccions, però, no semblen tenir cap associació amb la severitat del fenotip, tal com s'havia proposat amb anterioritat (Pines i col., 2001).

Molts pacients manifesten fatiga, degut al desenvolupament d'anèmia. Aquest fet provoca manca de concentració en els nens i que necessitin dormir moltes hores.

**MANIFESTACIONS PULMONARS.** Alguns pacients presenten problemes d'hipertensió pulmonar degut a la infiltració de cèl·lules de Gaucher als pulmons (Banjar i col., 1998). La severitat d'aquesta afectació sembla estar lligada a determinats factors genètics (predisposició familiar, determinats genotips, al·lel I de l'enzim convertidor d'angiotensina) i modificadors epigenètics (Mistry i col., 2002).

**MANIFESTACIONS DEL SISTEMA NERVIÓS.** Els malalts amb tipus I no presenten problemes en el sistema nerviós central, tot i que ocasionalment poden patir algunes manifestacions secundàries associades a les patologies òssies (per exemple, osteopènia severa amb compressió vertebral) o a la coagulació. Alguns pacients pateixen Parkinson, però no es coneix si es tracta d'una relació causa-efecte o d'una coincidència (Tayebi i col., 2001).

Els pacients classificats com a tipus II i III presenten afectacions al sistema nerviós, tals com atacs, deteriorament neurològic o manca de coordinació (Erikson i col., 1997). Els

pacients amb tipus II presenten un inici de la malaltia generalment temprà, cap als primers mesos de vida, i una ràpida progressió. Per contra, en els de tipus III l'inici pot produir-se a una edat més avançada i la progressió és més lenta. Alguns dels símptomes són la presència d'espasmes, atàxia, baix coeficient intel·lectual, pèrdua de l'equilibri, regressió psicomotora, oftalmoplègia, i atacs amb pèrdua de coneixement, entre altres.

**MANIFESTACIONS CARDIOVASCULARS.** Generalment els pacients afectes per la malaltia de Gaucher no manifesten afectacions cardiovasculars, malgrat tot alguns presenten un fenotip atípic, associat a un genotip determinat, i caracteritzat per la presència de calcificacions a les vàlvules mitral i aòrtica (Chabás i col., 1995; Abrahamov i col., 1995; Uyama i col., 1997; George i col., 2001).

**MANIFESTACIONS CUTÀNIES.** Les manifestacions cutànies, com la presència d'una pigmentació ocre suau, són poc freqüents i inespecífiques. Els problemes més greus s'han descrit en nens amb la forma neuronopàtica aguda amb la presència d'ictiosi neonatal severa o amb el fenotip col·lodion (Sidransky i col., 1992; Stone i col., 2000).

La manca de ceràmida podria ser la responsable d'alguns dels problemes cutanis, degut a que es troba implicada en el manteniment de la barrera de permeabilitat de l'epidermis (Holleran i col., 1994).

**ALTRES MANIFESTACIONS.** La infiltració de cèl·lules de Gaucher es dona sobre tot a la melsa, al fetge i al moll de l'os. Malgrat això, els pulmons i el cor, ja mencionats, i els ronyons es poden trobar afectats. La presència d'afectació renal no és excessivament coneguda però rarament es poden presentar algunes alteracions renals degut a aquesta infiltració (Chander i col., 1979).

Els pacients sovint presenten concentracions elevades de certes proteïnes al sèrum, com la ferritina i la quitotriosidasa, entre altres. Els nivells de colesterol-HDL són generalment baixos. Alguns pacients presenten alteracions en la concentració d'alguns marcadors ossis al sèrum (per exemple, l'osteocalcina) i l'orina (per exemple, l'hidroxiprolina urinària) sense que fins el moment no s'hi hagi pogut trobar una utilitat diagnòstica (Drugan i col., 2002; Ciana i col., 2003).

## 2.2- TIPUS CLÍNICS

La malaltia de Gaucher s'ha classificat tradicionalment en tres tipus clínics diferenciats per la presència i progressió de complicacions neurològiques i per l'edat d'aparició dels primers símptomes (Knudson i Kaplan, 1962) (taula 5). Aquesta classificació, però, és fa cada vegada més difícil degut a la presència de nombrosos fenotips intermedis entre els tipus II i III que provoquen, en realitat, l'existència d'un fenotip continu (Goker-Alpan i col., 2003).

**Taula 5:** Descripció dels tres tipus clínics de la malaltia de Gaucher. Freqüències obtingudes de Grabowski i col. (1993).

TIPUS CLÍNICS			
Clínica	Clínica	Clínica	Clínica
Inici	Tipus 1	Tipus 2	Tipus 3
Esplenomegàlia	+ → +++	++	+ → +++
Hepatomegàlia	+ → +++	++	+ → +++
Manifestacions òssies	- → +++	--	++ → +++
CNS	Absent	+++	+ → +++
Durada de la vida	6 a +80 anys	~2 anys	2 a 60 anys
Grup ètnic/ demogràfic	- General - Jueus Asquenazis	General	- General - Norrbottnian
Freqüència	- ~1/40.000 a 1/60.000 - ~1/400 a 1/500 (JA)	<1/100.000	~ 1/50.000 a 1/100.000

### 2.2.1- TIPUS I: NO NEURONOPÀTIC

El tipus I de la malaltia de Gaucher (MIM 230800) és el més freqüent. Presenta una elevada prevalença en la població jueva asquenazita (1/400-1/600), però es troba també present en molts grups ètnics (1/40.000-1/60.000) (Grabowski, 1993).

El tipus I es caracteritza per una hepatoesplenomegàlia massiva i la manca de manifestacions neurològiques. Aquest engrandiment del volum del fetge i la melsa causa la seva disfunció així com el desplaçament del moll de l'os i la pèrdua de d'os provocant, com a conseqüència, infarts i fractures.

Són freqüents les citopènies, abans ja comentades. I entre elles les més greus són les trombopènies, causades per segrestament de plaquetes a la melsa.

Malgrat que la majoria de pacients amb tipus I són adults, també ha estat descrit en nens, els quals presenten un fenotip més greu amb hepatoesplenomegàlia associada amb una disfunció hepàtica severa i nombroses anormalitats esquelètiques (per exemple, fèmur en forma de matràs d'Erlenmeyer) (Ida i col., 1999b).

En adults l'edat d'aparició i la severitat dels símptomes són molt variats, es poden trobar des de casos asimptomàtics fins a casos realment greus. És freqüent l'existència de pacients tipus I no diagnosticats per la manca de manifestacions clíniques. Molts d'ells han estat descoberts després d'estudis familiars (Zimran i col., 1991).

Quasi tots els pacients presenten alguns graus d'osteopènia i osteolisi. Molts d'ells experimenten *crisis òssies* o *crisis de dolor* a la cadera, els braços, l'esquena i les espatlles. Aquestes es caracteritzen per episodis de febre i dolor intens, associant-se a la isquèmia de la medul·la òssia. Els canvis degeneratius a l'esquelet són la principal causa d'invalidesa en els pacients de tipus I.

Alguns pacients presenten una pigmentació ocre a la pell, cara i cames (Cremin i col., 1990), així com fatiga, retards en el creixement i la dentició. Menys freqüentment, pateixen problemes renals, hipertensió pulmonar i anormalitats cardíques.

### **2.2.2- TIPUS II: NEURONOPÀTIC AGUT**

La malaltia de Gaucher Tipus II (MIM 230900) és de ràpida progressió, afectant tant al cervell com altres òrgans que també es veuen afectats en el pacients de tipus I.

Aquesta forma de la malaltia de Gaucher és més uniforme i no sembla tenir predileccions ètniques (Ho i O'Brien, 1971). Els nens presenten un desenvolupament normal durant els primers mesos de vida abans de manifestar els primers símptomes neurològics així com molts dels símptomes associats a la malaltia de tipus I. Cap als 3 mesos de vida s'inicia el desenvolupament d'una acusada hepatoesplenomegàlia i un quadre de regressió psicomotriu, atàxia oculomotora, retroflexió del coll, espasticitat, afectació bulbar amb trastorns principalment en la deglució i, com a conseqüència de la elevada presència de cèl·lules de Gaucher als alvèols i capil·lars pulmonar, es produeix fibrosi i hipertensió pulmonar (revisat per Baldellou, 1999). La prevalença és de 1/100.000 naixements vius (Grabowski, 1993).

Els nens afectes per la malaltia de Gaucher tipus II generalment no superen els 2 anys de vida, degut a la severa i ràpida afectació del sistema nerviós central.

Existeixen però, alguns casos en que la mort es produeix abans o poc després del naixement i que poden ser diagnosticats dintre d'altres malalties. Un exemple, és el cas dels nens amb fenotip col·lodion, els quals tenen la pell

extraordinàriament prima i sensible, i que pot derivar en una forma clàssica de ictiosi. Aquesta forma de la malaltia de Gaucher podria trobar-se subestimada per errors diagnòstics (Stone i col., 1999).

Els problemes cutanis són característics dels pacients amb el tipus II de la malaltia. Són constants les alteracions bioquímiques (increment del coeficient glucosilceramida/ceramida) i les anomalies estructurals (hiperqueratnosi, hiperplàsia epidèrmica i paraqueratnosi amb absència de capa granular) que justifiquen els problemes funcionals de la barrera cutània i les manifestacions dermatològiques dels pacients (Fujimoto i col., 1995; Sidransky i col., 1996a).

### 2.2.3- TIPUS III: NEURONOPÀTIC SUBAGUT

El tipus III, antigament anomenat **malaltia de Gaucher juvenil** (MIM 231000), es caracteritza per una lenta progressió neurològica de la malaltia. La seva incidència és de 1/50.000 a 1/100.000 naixements vius (Grabowski, 1993).

Els signes i símptomes de la malaltia de Gaucher tipus III apareixen en l'edat infantil o juvenil, en funció dels casos, amb afectació neurològica juntament amb una afectació visceral indiscernible de l'observada en pacients de tipus I. L'afectació neurològica (oftalmoplègia epilèpsia, atàxia, espasticitat, deteriorament intel·lectual, etc.) és menys greu

i ràpida que la dels pacients de tipus II. Els individus amb el tipus III que arriben a l'adolescència poden sobreviure fins a la tercera o quarta dècada de vida.

El tipus III no sembla tenir predilecció per cap grup ètnic, però és particularment freqüent entre els habitants d'una província del Nord de Suècia (Norrbottnia). L'origen geogràfic dels malalts dona nom a aquest tipus clínic, forma Norrbottnia. En aquesta població tots els malalts tenen la mateixa mutació, però malgrat això l'heterogeneïtat fenotípica és destacable (Dahl i col., 1990; Dahl i col., 1993).

---

## 3- DIAGNÒSTIC

### 3.1- DIAGNÒSTIC MORFOLÒGIC

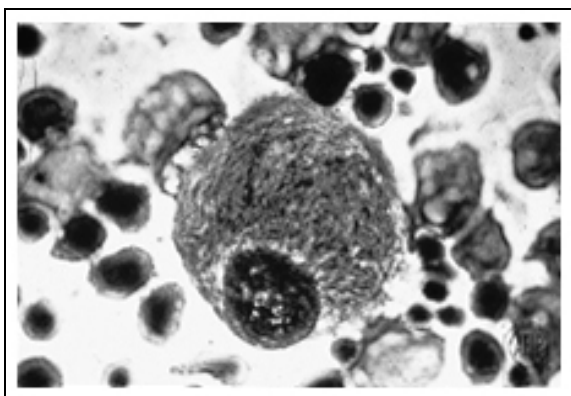
Tradicionalment el diagnòstic de la malaltia de Gaucher es realitzava des del punt de vista estrictament morfològic, amb la detecció de les anomenades **cèl·lules de Gaucher** a la medul·la òssia, fetge o melsa (Charrow i col., 1998). Es tracta de monòcits transformats en els quals es produeix l'acumulació de glucoceramides i que adquireixen, com a conseqüència, unes característiques diferenciadores (figura 10).

Les cèl·lules de Gaucher són tenyides positivament amb PAS (*Periodic Acid Schiff*) fet



que reflexa l'acumulació de glicolípids a l'interior dels vacúols del citoplasma. En funció del grau d'acumulació lipídica trobem variacions en altres trets clínics com són la pancitopènia, la degradació osteolítica i l'osteopènia de l'esquelet o l'afectació del SNC.

Malgrat que actualment, les tècniques bioquímiques i moleculars són les més emprades per al diagnòstic de la malaltia de Gaucher, degut a que són menys invasores i més específiques, les morfològiques segueixen sent de gran utilitat.



**Figura 10:** Macròfag carregat de lípids o "cèl·lula de Gaucher". Són grans i poden ser mono o multinucleades

### 3.2- DIAGNÒSTIC ENZIMÀTIC

El mètode més emprat per al diagnòstic de la malaltia de Gaucher és l'assaig de l'activitat  $\beta$ -glucocerebrosidasa (Beutler i Kuhl, 1990) a partir de leucòcits de sang perifèrica, de cultius de fibroblast, de cèl·lules del líquid amniòtic o de vellositats coriòniques. La determinació de

l'activitat enzimàtica es realitza mitjançant un test fluoromètric basat en l'ús d'un substrat generalment sintètic, el 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-glucopiranosid. Per al diagnòstic enzimàtic és també necessària la presència de detergents i/o sals biliars als lisats cel·lulars per activar l'enzim, el qual es troba estretament lligat a la membrana lisosomal (Beutler i Kuhl, 1970; Wenger i col., 1978; Raghavan i col., 1980).

Els pacients presenten nivells del 10 al 30% de l'activitat enzimàtica present en població sana. Els valors d'activitat dels portadors són intermedis entre els valors dels pacients i els dels individus sans, però poden encavalcar-se tant amb la porció més alta dels individus afectats com amb la més baixa dels individus sans (Beutler i Grabowski, 1995). És per aquesta raó que s'han proposat nous mètodes que permetin realitzar aquesta discriminació.

Un d'aquests mètodes, el FACS (*fluorescence-activated cell sorter*), es basa en determinar l'activitat  $\beta$ -glucosidasa àcida mitjançant citometria de flux. És un mètode sensible i específic que permet tant la identificació dels pacients com la separació entre controls, portadors i pacients (Rudensky i col., 2003).

Un altre dels mètodes recentment desenvolupat, es basa en la determinació de l'activitat a partir d'una gota de sang seca situada sobre un paper de filtre (Chamoles i col., 2002). Un diàmetre de 3 mm de la gota de sang són suficients per a la determinació de l'activitat enzimàtica per mètodes fluoromètrics. És un mètode senzill, fiable i fàcilment estandaritzable, fet que permet

l'anàlisi d'un elevat nombre de mostres (Chamoles i col., 2002).

### 3.3- DIAGNÒSTIC MOLECULAR

El diagnòstic basat en l'anàlisi de DNA té importants avantatges respecte el diagnòstic enzimàtic: les mostres són més estables i permet la identificació de portadors.

En ocasions és possible predir el tipus de la malaltia en funció del genotip del pacient. És el cas dels que presenten la mutació N370S, els quals no arribaran a manifestar problemes neurològics.

S'han descrit nombroses mutacions en el gen de la  $\beta$ -glucosidasa àcida responsables de la malaltia de Gaucher. En pacients d'origen jueu s'ha comprovat que existeixen 4 mutacions (N370S, 84GG, L444P i IVS2+1) que representen el 96% dels al·lels mutats (Beutler, 1992a). En canvi, en població no jueva quasi la tercera part dels al·lels mutats corresponen a una ampla varietat de mutacions molt poc freqüents.

A la població espanyola, dues mutacions (N370S i L444P) representen el 70% dels al·lels Gaucher (Cormand i col., 1995), fet que implica que aproximadament el 50% dels pacients són portadors almenys d'un al·lel poc freqüent. En aquests casos és recomanable l'ús de marcadors altament polimòrfics per a realitzar el diagnòstic molecular indirecta de la malaltia de Gaucher (Cormand i col., 1998b).

Aquesta estratègia és útil per al diagnòstic de portadors o el prenatal en famílies que tenen algun individu afecte.

En els darrers anys s'han desenvolupat estratègies per tal de realitzar aquest diagnòstic a partir de petites quantitats de sang seca que poden ser enviades al laboratori de diagnòstic amb facilitat (Devost i Choy, 2000). Aquestes gotes de sang seca situades sobre un paper de filtre FTA<sup>®</sup> són estables a temperatura ambient i poden ser conservades durant alguns anys. Sobre elles és possible realitzar una anàlisi mutacional seguint mètodes tradicionals de detecció de mutacions (PCR més digestió o seqüenciació) (Devost i Choy, 2000).

---

## 4- BIOQUÍMICA

La malaltia de Gaucher és un trastorn congènit del metabolisme causat per un defecte en la síntesi d'una hidrolasa lisosomal, la  $\beta$ -glucosidasa àcida (GBA). La manca o molt baixa activitat d'aquest enzim que catalitza la hidròlisi dels enllaços  $\beta$ -glucosídics provoca l'acumulació lisosòmica del glucocerebròsid (o glucosilceremida). Aquest lípid altament insoluble és el penúltim producte de la via de degradació dels glucoesfingolípids més complexos (globòsids i gangliòsids) (figura 11).

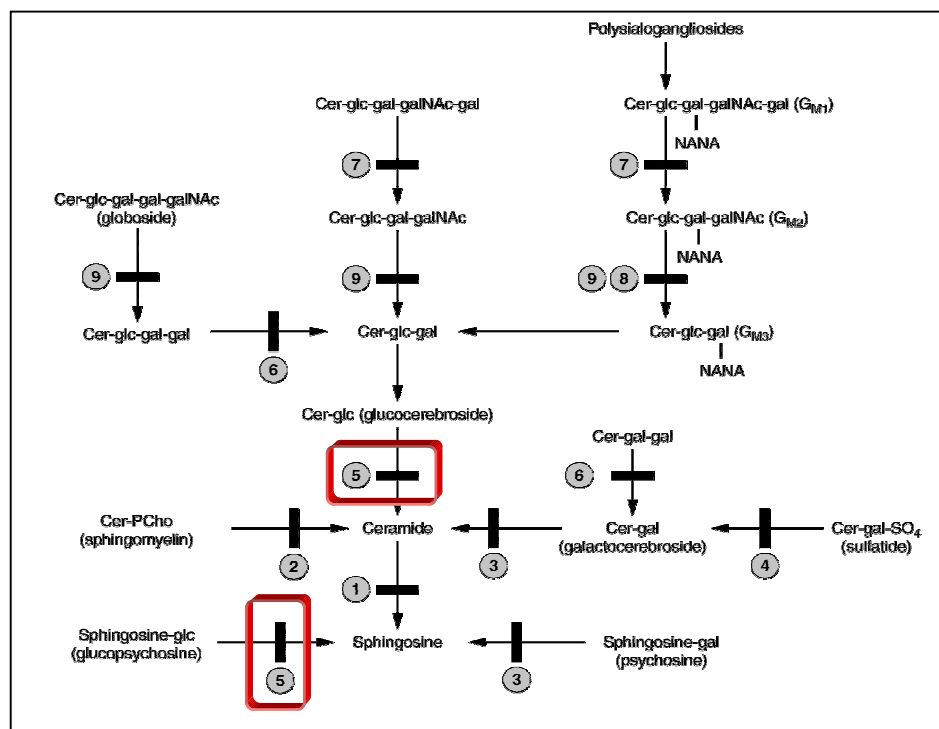
## 4.1- L'ENZIM: GBA

La glucocerebrosidasa és una glucoproteïna estretament lligada a la membrana cel·lular. El polipèptid madur conté 497 aminoàcids amb un pes molecular que varia en funció del seu grau de glicosilació. L'enzim hidrolitza no només la glucosilceramida sinó també altres substrats  $\beta$ -glucosídics artificials, i és inhibit irreversiblement pel CBE (conduiritol B-expòsid).

És un enzim de naturalesa hidrofòbica, fet que fa necessari l'ús de detergents, lípids carregats

negativament així com la proteïna activadora saposina C per a una òptima hidròlisi tant del substrat natural com de l'artificial. També el pH intralisosòmic és important per l'òptim funcionament de l'enzim.

Recentment, s'ha obtingut l'estructura de la GBA humana (Dvir i col., 2003). Aquest fet, juntament amb estudis anteriors basats en modificacions químiques i estudis de mutagènesi dirigida, han facilitat la identificació d'alguns residus importants per a la funció de l'enzim.



**Figura 11:** Relació química i metabòlica entre els principals esfingolípids. Els passos catabòlics normals estan indicats amb fletxes. La biosíntesi té lloc seguint el sentit contrari. Els números corresponen a les següents malalties: 1. Malaltia de Farber; 2. Niemann-Pick (tipus A i B); 3. Malaltia de Krabbe; 4. Leucodistrofia metacromàtica; 5. Malaltia de Gaucher; 6. Malaltia de Fabry; 7. Gangliosidosi GM1; 8. Gangliosidosi GM2 (malaltia de Tay-Sachs, variant B1, variant AB); 9. Gangliosidosi GM2 (malaltia de Sandhoff). (Figura 41-1, Basic Neurochemistry, 6th edn, Lippincott Williams & Wilkins, the American Society for Neurochemistry.)

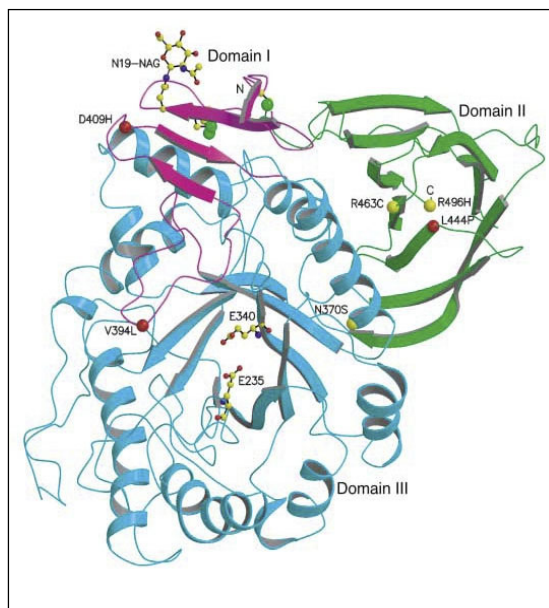
#### 4.1.1- ESTRUCTURA I CENTRE ACTIU

La GBA pertany a les glucosil hidrolases, les quals han estat classificades en 63 famílies en funció de la similaritat de la seva seqüència aminoacídica (Henrissat 1991; Henrissat i Bairoch, 1993,1996; Mian, 1998). Part d'aquestes famílies, un total de nou, es creu que poden tenir un ancestre comú (Henrissat i col., 1995; Jenkins i col., 1995). Entre elles es troba la família 30, a la qual pertany la  $\beta$ -glucosidasa àcida humana.

Recentment s'ha obtingut l'estructura de la GBA per estudis de raigs X (Dvir i col., 2003). S'ha demostrat que el plegament de la glucocerebrosidasa origina tres dominis diferents (figura 12).

El primer, s'estén des del residu 1 al 27 i del 383 al 414, i es troba estructurat en 3 làmines  $\beta$  antiparal·leles, més una perpendicular a elles on es situa el grup amino terminal i un *loop*. Conté també dos ponts disulfur (residus 4-16 i 18-23), que es creu que poden ser necessaris per al correcte plegament de la proteïna (Beutler i Grabowski, 2001).

El segon domini, comprès entre els residus 30-75 i 431-497, es troba format per dues làmines  $\beta$  estretament associades que recorden una immunoglobulina (Ig). El tercer (residus 76-381 i 416-430), conté el domini catalític, el qual es troba estructurat formant un *TIM barrel* que conté 8 làmines  $\beta$  i 8 hèlix  $\alpha$  ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>. Conté també tres cisteïnes lliures (Cys126, 248 i 342).



**Figura 12:** Estructura per raigs X de la  $\beta$ -glucosidasa àcida (Dvir i col., 2003). L'enzim s'estructura en tres dominis diferents. Domini I (grana): conté dos ponts disulfur i el primer lloc de N-glicosil·lació (N19). Domini II (verd): conté l'aminoàcid L444 i és un domini semblant a una immunoglobulina. Domini III (blau): domini catalític format per 8 làmines  $\beta$  i 8 hèlix  $\alpha$ . Els aminoàcids E235 i E340 actuen com a catalitzador àcid/base i nucleòfil, respectivament. Amb boles es marquen les posicions de les mutacions més freqüents de la malaltia de Gaucher (grogues = lleus, vermelles = severes).

Les glucosil hidrolases hidrolitzen enllaços glucosídics mitjançant un mecanisme catalític que implica la presència de dos residus d'àcid glutàmic que actuen, un com a catalitzador àcid/base i, l'altre, com a nucleòfil. Per mitjà de mètodes comparatius de l'estructura secundària, estudis de mutagènesi dirigida i d'espectrometria de massa, ambdós han estat localitzats prop de l'extrem C-terminal de les làmines  $\beta$ 4 (E235) i  $\beta$ 7 (E340) del domini catalític, respectivament (Miao i col., 1994; Durand i col., 1997; Mian, 1998).