

#### 4.1.2- COMPARACIONS DE SEQÜÈNCIA INTERESPECÍFIQUES

La  $\beta$ -glucosidasa àcida ha estat descrita en diferents organismes. A la taula 6 es mostres les espècies en les quals s'ha descrit o bé la proteïna o bé una seqüència que presenta certa similaritat aminoacídica respecte a la seqüència humana.

Per al cas de la *Drosophila melanogaster*, tot i presentar una similaritat baixa, la seqüència descrita presenta activitat glucocerebrosidasa.

La seqüència de ratolí és de totes elles la que presenta un major interès, pel seu elevat valor com a eina en el desenvolupament d'un model animal. La seqüència de ratolí conté un pèptid senyal de 19 aminoàcids, codifica per la proteïna madura de 496 aminoàcids i, a diferència de la seqüència humana, presenta un únic ATG situat a l'exó 2 (O'Neill i col., 1989). El gen es troba estructurat, a l'igual que l'humà, en 11 exons i 10 introns, i ha estat mapat al cromosoma 3 murí (O'Neill i col., 1989).

**Taula 6:** Gens o seqüències homòlogues trobades en diversos organismes que codifiquen per la  $\beta$ -glucosidasa àcida (d'acord amb MGD Abr 08 2003, [HomoloGene](#), [Stony Brook C.elegans-H.sapiens Alignment Database](#) i/o [euGenes](#), amb possibles connexions addicionals a [Flybase](#) i/o [WormBase](#)). Els valors de similaritat aminoacídica han estat valorats amb el *GenomeNet CLUSTALW Server*.

ESPÈCIES	GEN	LOCUS	%SIMILARITAT aminoacídica	AccID o NCBI
humà	GBA	1 (q21)	100	GDB:119262 ( <a href="#">GDB-US</a> ) 2629 ( <a href="#">LocusLink</a> )
ratolí, laboratori (MGD)	Gba	3 (41,7 cM)	85,83	<a href="#">MGI:95665</a> , <a href="#">AK082767</a> , <a href="#">BC006663</a> , <a href="#">M24119</a> , <a href="#">M89949</a> , <a href="#">LocusLink:14466</a> , <a href="#">NM_008094.1</a>
Ximpanzé	GBA	--	99,25	<a href="#">AF272642</a> , <a href="#">AF285236</a>
Porc, domèstic	GBA	4	89,74	GBA ( <a href="#">PigBASE</a> )
Goril·la	$\Psi$ GBA	--	--	<a href="#">AF272641</a>
Cavall	GBA	5	-- (parcial)	GBA ( <a href="#">HorseBase</a> )
Vaca (HomoloGene)	Bt.5413 <sup>+</sup>	3	--	GBA ( <a href="#">BOVMAP</a> ), <a href="#">AW461855.1</a>
Rata (HomoloGene)	Rn.52019 <sup>+</sup>	--	--	<a href="#">BE111793.1</a>
<i>D.melanogaster</i> (euGenes)	CG31148	95A8	25,75	<a href="#">FBgn0051148</a>
<i>C. elegans</i> (euGenes)	<a href="#">Y4C6B.6</a> *	IV 5.344.594..5.350.905	36,99	<a href="#">AAD14768</a>

\*seqüència predita

<sup>+</sup>EST.

En la seqüència humana, l'aminoàcid E340, present en el centre actiu com el nucleòfil de la reacció d'hidròlisi de l'enllaç  $\beta$ -glucosídic, es troba situat en una regió que presenta el 100 % d'identitat aminoacídica respecte a la seqüència de ratolí (residus 315-375) (O'Neill i col., 1989).

Tant en la seqüència de ximpanzé i com en la de goril·la, a l'igual que en la seqüència humana, s'ha descrit la presència d'un pseudogèn, mentre que en el ratolí i en altres organismes no s'ha descrit. Al comparar les seqüències del gen de la *GBA* i del seu pseudogèn, en humans i ximpanzés, es fa palès que els pseudogens d'ambdues espècies estan més relacionats entre ells que els propis gens paràlegs (Martinez Arias i col., 2001).

#### 4.1.3- SÍNTESI I PROCESSAMENT

La  $\beta$ -glucosidasa àcida es sintetitza per mecanismes similars als d'altres glicoproteïnes. Aquest procés de síntesi té lloc als ribosomes associats al reticle endoplasmàtic, formant-se un polipèptid de 58 kDa, amb un pèptid senyal que facilita la seva translocació al lumen del reticle endoplasmàtic (figura 13).

El pèptid senyal té una longitud de 39 o 19 aminoàcids degut a la presència de dos inicis de traducció diferents, ambdós funcionals (Sorge i col., 1987). L'eliminació del pèptid senyal, és seguida de la incorporació de quatre

cadena d'oligonucleòtids complexes en posicions N19, N59, N146 i N270, formant-se així un polipèptid de 63 kDa. L'ocupació del primer lloc sembla ser necessària per al plegament co-traduccional de l'enzim durant la seva síntesi (Berg-Fussman i col., 1993).

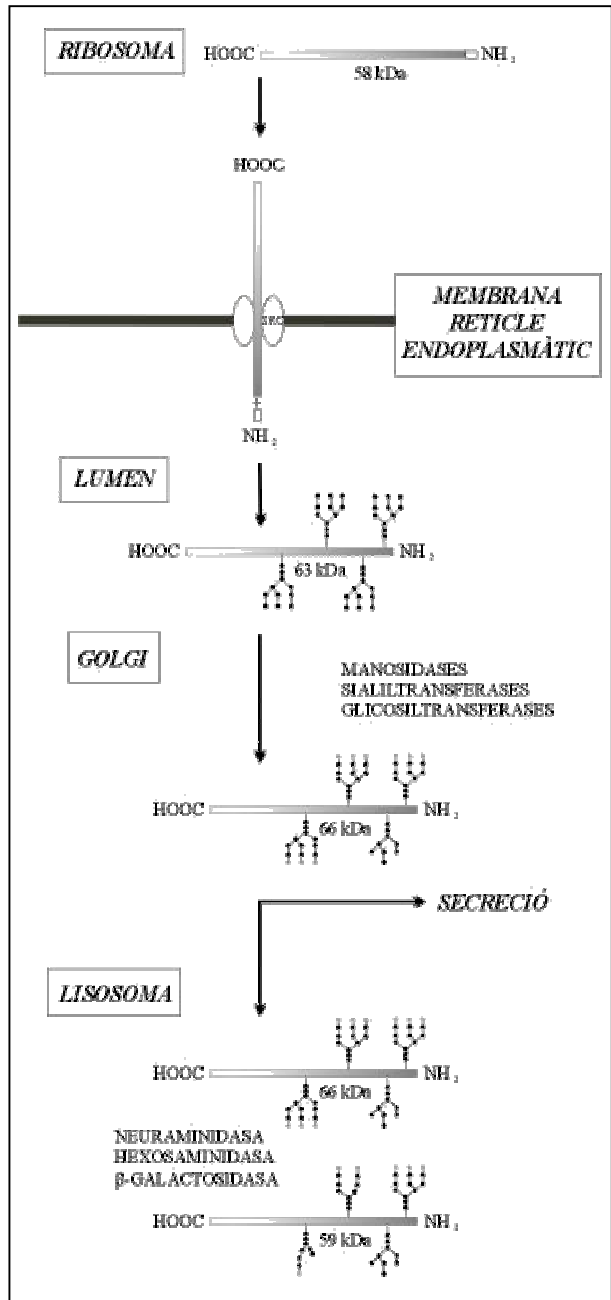


Figura 13: Esquema de la biosíntesi de l'enzim  $\beta$ -glucosidasa àcida (adaptat de Barranger i Ginns, 1989).

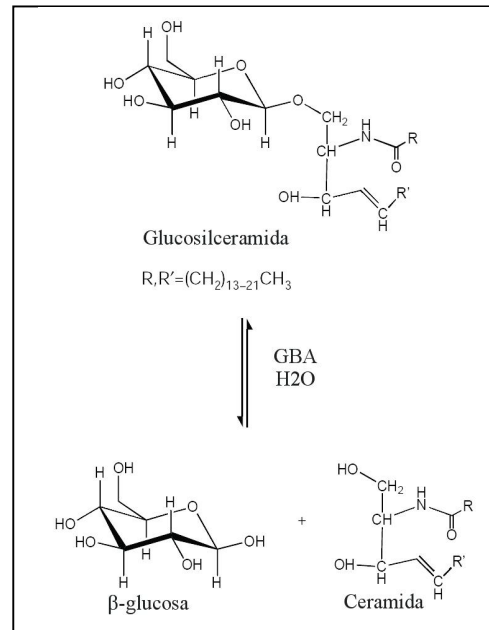
Aquest polipèptid de 63 kDa és processat de camí cap al complex de Golgi per l'acció de manosidases, sialiltransferases i glicosiltransferases, formant-se un polipèptid de 66 kDa. Aquest pot ser excretat en petites quantitats o entrar als lisosomes on acaba el seu processament, amb la formació d'una molècula de 59 kDa (Barranger i Ginns, 1989).

## 4.2- EL SUBSTRAT

El principal substrat natural de la GBA és un glucoesfingolípíd que rep el nom de N-acil-esfingosil-O- $\beta$ -D-glucòsid, també anomenat glucosilceramida, ceramida- $\beta$ -glucòsid o glucocerebròsid (figura 14) (Grabowski, 1993). Els glucoesfingolípídids contenen un grup ceramida hidrofòbic (part lipídica) que actua d'ancoratge a la membrana cel·lular i una cadena glicà (part glucídica) orientada cap a la part extracel·lular. La ceramida, per la seva part, es troba formada per una cadena llarga aminoalcohol acetilada per un àcid gras. Els glucoesfingolípídids són heterogenis, poden variar tant en la porció ceramida com en el carbohidrat que els formen. Pel cas de la glucosilceramida, la glucosa és el carbohidrat que la compon.

Els glucoesfingolípídids mantenen un patró específic de tipus cel·lular a la superfície de les cèl·lules eucariotes que pot canviar amb el creixement cel·lular, la diferenciació, la transformació viral i l'oncogènesi (Hakomori,

1981). Poden influir en diferents processos cel·lulars, com la embriogènesi, la diferenciació neuronal i leucocitària, l'adhesió cel·lular i la transducció de senyal (Kolter i Sandhoff, 1998).



**Figura 14:** Estructura del glucocerebròsid o glucosilceramida. El mecanisme catalític de ruptura de l'enllaç  $\beta$ -glucosídic implica la producció de ceramida, la donació d'una molècula d'aigua al complex enzim-glucosa i l'alliberació d'una molècula de  $\beta$ -glucosa (Grabowski i col., 1990).

La glucosilceramida es troba distribuïda de manera àmplia a les membranes cel·lulars de la majoria de teixits dels mamífers com a metabòlit intermediari en la síntesi i degradació dels glucoesfingolípídids complexos com els gangliòsids.

Existeixen estudis recents que intenten avaluar la relació entre les elevades concentracions de glucosilceramida i diferents paràmetres de la fisiologia neuronal. Segons aquests estudis, l'acumulació de glucosilceramida es correlaciona amb un increment de la

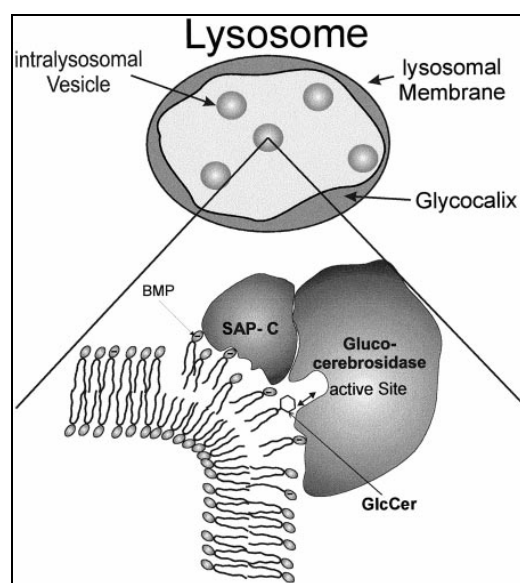
mobilització de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular via receptor de rianodina (Korkotian i col., 1999; Lloyd Evans i col., 2003) i, amb un increment de la síntesi de fosfatidilcolina (Bodennec i col., 2002) provocant canvis en la funcionalitat neuronal. Calen, però, més estudis per tal de conèixer com l'acumulació del substrat provoca aquests increments i, com aquests i de quina manera afecten el normal desenvolupament de les neurones.

Existeix un substrat minoritari, la glucosilceramida, però patogènicament important (Grabowski, 1993). S'han trobat elevades concentracions d'aquest substrat en mostres de cervell de pacients de tipus II i III, fet que suggereix que aquest lípid també podria estar implicat d'alguna manera en la degeneració del SNC (Nilson i Svennerholm, 1982; Nilsson i col., 1985).

### 4.3- MECANISME CATALÍTIC

El mecanisme de degradació lisosòmic de les molècules de glucosilceramida requereix la presència de l'enzim  $\beta$ -glucosidasa àcida i d'un cofactor, la saposina C (SAP-C) (Furst i Sandhoff, 1992). Aquest procés es dona en un compartiment àcidic de les cèl·lules, els lisosomes. Els glicoesfingolípids arriben al compartiment lisosòmic per endocitosi, com a components de vesícules (Sandhoff i Klein, 1994; Furst i Sandhoff, 1992).

La GBA requereix de la presència de detergents carregats negativament, per completar el seu procés d'activació (Kishimoto i col., 1992; Vaccaro i col., 1994; Qi i col., 1996). Malgrat que la composició lipídica de les membranes intralisosòmiques no és encara totalment coneguda, sabem que contenen alguns fosfolípids com la fosfatidilserina, el dolicol fosfat i el bis(monoacilglicero)fosfat (BMP). Es creu que la SAP-C juntament amb fosfolípids aniònics dels lisosomes, especialment el BMP, marquen les vesícules que contenen glucosilceramida i faciliten la interacció d'aquestes molècules amb les de l'enzim soluble (revisat per Wilkening i col., 1998) (figura 15) a pH àcid mitjançant un canvi conformacional en l'enzim (Grabowski i Horowitz, 1997).



**Figura 15:** Model per a la degradació de la glucosilceramida (GluCer), en el qual la SAP-C i els fosfolípids aniònics juguen un paper molt important en la unió de la glucocerebrosidasa al substrat (Wilkening i col., 1998).

Es creu que la SAP-C desestabilitza la membrana, promovent l'associació de la GBA amb aquests fosfolípids (Vaccaro i col., 1995). Segons alguns estudis, la SAP-C no actuaria només en l'activació de l'enzim sinó que també s'uniria a la superfície vesicular (Wilkening i col., 1998).

1985) va permetre la identificació d'un gen funcional i un pseudogèn (Reiner i col., 1988; Horowitz i col., 1989).

### 5.1.1- ESTRUCTURA: GEN-PSEUDOGÈN

La seqüència completa del gen *GBA* i del seu pseudogèn ( $\psi$ *GBA*) es va obtenir al 1989 (Horowitz i col., 1989) i, posteriorment es van realitzar algunes correccions (Beutler i col., 1992b) en la seqüència del gen inicialment descrita.

## 5- GENÈTICA

La malaltia de Gaucher presenta un patró d'herència autosòmic recessiu i està causada per mutacions en el gen que codifica la GBA i, en uns pocs casos, per mutacions en el gen que codifica la prosaposina.

El pseudogèn es troba a 16 Kb a 3' del gen funcional (Zimran i col., 1990b) i manté una elevada identitat nucleotídica amb ell, d'un 96% (Horowitz i col., 1989).

### 5.1- EL GEN *GBA*

El gen *GBA* té una longitud de 7,5 Kb i es troba estructurat en 11 exons, mentre el pseudogèn s'estén per 5,8 Kb i es troba també estructurat en 11 exons (figura 16).

El clonatge del cDNA de la  $\beta$ -glucosidasa àcida humana (Ginns i col., 1984; Sorge i col.,

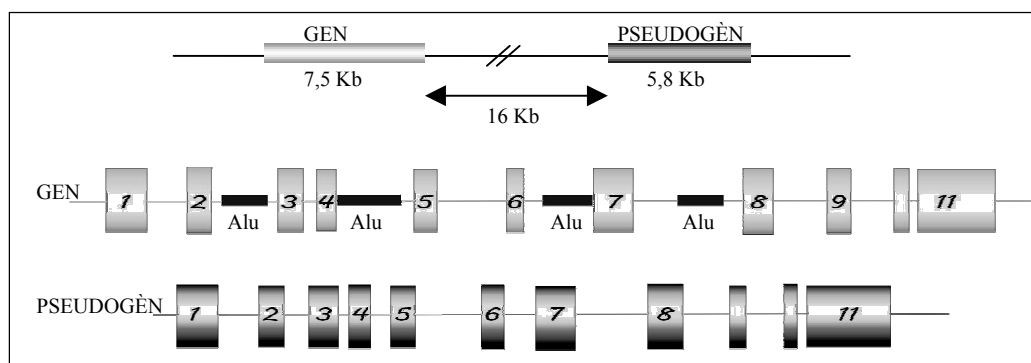


Figura 16: Estructura del gen i el pseudogèn de la  $\beta$ -glucosidasa àcida.

La mida dels onze exons del gen oscil·la entre 88 pb i 648 pb, mentre que els introns varien entre 104 pb i 956 pb. La diferència observada entre la longitud del gen i el pseudogèn és deguda a que el primer conté quatre elements *Alu* situats als introns 2 (312 pb), 4 (626 pb), 6 (320 pb) i 7 (277 pb) (figura 16). Tenint en compte que les seqüències *Alu* són elements mòbils (Schmid i Jelinek, 1982), es creu que poden provocar la generació de grans delecions i insercions. El pseudogèn, a part de la manca de seqüències *Alu*, conté també diverses substitucions i petites delecions en introns i exons, com les situades als exons 9 (55 pb) i 4 (5 pb), que fan que sigui impossible la seva traducció a causa de la formació temprana de codons d'aturada. Malgrat això es transcriu (Sorge i col., 1990).

L'existència del pseudogèn complica la identificació de les mutacions presents en el gen degut a la elevada identitat existent entre ambdós i facilita l'intercanvi de fragments de DNA, donant lloc a al·lels no funcionals anomenats Rec (recombinants) (Zimran i col., 1990b). Molts d'aquests al·lels poden tenir el seu origen en l'entrecruament desigual entre gen i pseudogèn, mentre que altres poden tenir el seu origen en la conversió gènica (Koprivica i col., 2000; Tayebi i col., 2003).

Els gens *GBA* murí i caní no presenten pseudogèn mentre que el del ximpanzé sí. Sabem que els grans simis van divergir fa uns 25 milions d'anys. Aquest fet, junt amb la presència de seqüències *Alu* (membres de la família Sx, datats de fa uns 40 milions d'anys), fa pensar que fa entre 25 i 40 milions d'anys es

produí una duplicació en *tandem* que originà dues còpies del gen *GBA* i dues d'un gen contigu, la metaxina, les quals han anat divergint fins a originar un gen funcional i un pseudogèn de cadascuna d'aquestes seqüències (Winfield i col., 1997).

### 5.1.2- MAPATGE

El gen de la  $\beta$ -glucosidasa àcida va ser mapat al cromosoma 1 a la regió q21 (Ginns i col., 1985).

És una regió altament rica en gens (figura 17), en ella s'han identificat set gens funcionals i dos pseudogens (AF023263) (Winfield i col., 1997). Tots els gens, excepte el de la metaxina, són transcrits en el mateix sentit. La presència dels dos pseudogens, que presenten una elevada identitat respecte als corresponents gens, incrementa la probabilitat de reordenacions.

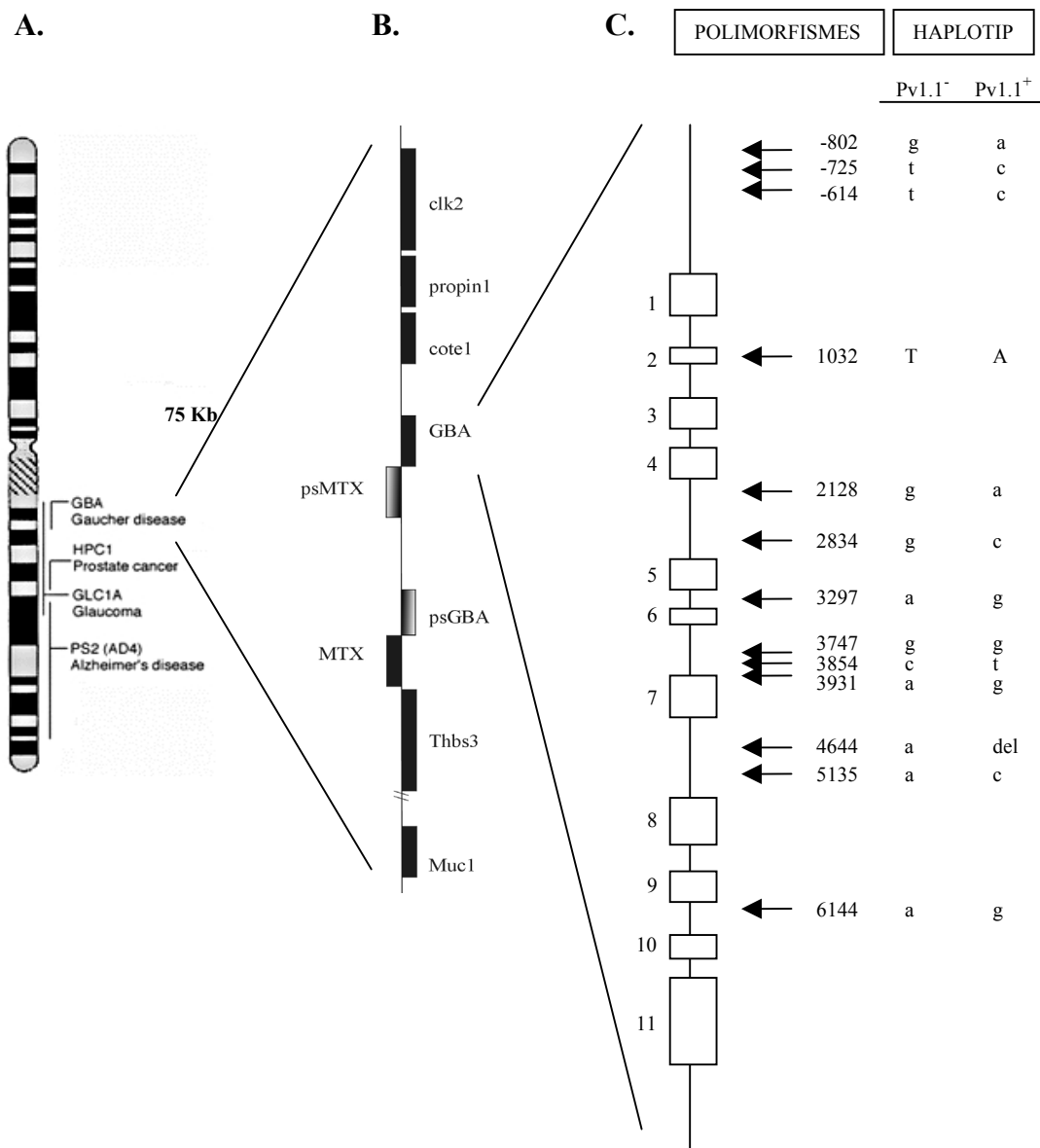
A l'any 1997 es realitzà la localització del gen en relació a marcadors altament polimòrfics del cromosoma 1 (Cormand i col., 1997a). Tres d'aquests marcadors (D1S2140, D1S2777 i D1S2721) es troben a 0 cM del gen, mentre que els marcadors D1S305 i D1S2624 es troben a 1,6 cM a ambdós costats del gen.

El mapatge fi del gen *GBA* ha permès realitzar el diagnòstic indirecte de la malaltia (Cormand i col., 1998b) així com identificar el putatiu haplotip ancestral en el qual s'hauria originat la mutació N370S (Cormand i col., 1998a).

**5.1.3- POLIMORFISMES**

En la seqüència del gen que codifica per la  $\beta$ -glucosidasa àcida han estat descrits tretze polimorfismes diferents, entenent com a polimorfismes aquells canvis en la seqüència normal del gen que no porten al

desenvolupament de la malaltia. Dels tretze polimorfismes trobats, dotze es troben en la zona no codificant, i s'ha comprovat que tots es troben en un fort desequilibri de lligament, donant lloc a dos haplotips majoritaris, anomenats Pv1.1<sup>+</sup> i Pv1.1<sup>-</sup> (figura 17) (Zimran i col., 1990a; Beutler i col., 1992b; Horowitz i col., 1993; Amaral i col., 1997).



**Figura 17:** (A) Localització cromosòmica del gen responsable de la malaltia de Gaucher, (B) esquema de la regió genòmica en la qual es troba el gen de l'àcid  $\beta$ -glucosidasa i (C) situació dels principals polimorfismes descrits en el gen.

En població portuguesa s'ha trobat un altre polimorfisme situat a l'intró 7, és un canvi d'una G per una A en posició g5470. Es troba únicament en un 11% dels al·lels portadors de la mutació N370S i, per tant, es creu que estem davant d'un polimorfisme recent que s'hauria produït per primera vegada després de l'origen de dita mutació (Amaral i col., 1997). Lau i col·laboradors (1999) identifiquen també aquest polimorfisme en un pacient d'origen jueu asquenazi. En població espanyola, ha estat identificat en 7 de 57 al·lels portadors de la mutació N370S (Rodríguez Mari i col., 2001). Els resultats obtinguts fins el moment fan pensar que es tracta d'un polimorfisme que podria trobar-se confinat a la Península Ibèrica, però calen més estudis per a confirmar-ho (Rodríguez Mari i col., 2001).

#### **5.1.4- ESTRUCTURA, ORGANITZACIÓ I EXPRESSIÓ**

El gen *GBA* s'estén per unes 7 kb i es troba estructurat en 11 exons. El cDNA té aproximadament 2,5 Kb (Sorge i col., 1985). Existeixen dos ATGs funcionals, separats per 20 aminoàcids que formen part del pèptid senyal (Sorge i col., 1987; Pasmanik-Chor i col., 1996a).

L'anàlisi de la regió 5' revela l'existència de seqüències promotores que contenen caixes TATA (-23 a -27) i CAAT (-90 a -94) i que es troben aproximadament en els 250 pb *upstream* de l'inici de traducció. Els elements reguladors

*in vitro* (enhancers i supressors) es troben al primer exó, tant a les seqüències codificants com a les no codificants.

L'expressió del gen *GBA* és ubiqua però sembla tenir uns nivells d'expressió diferents en funció del teixit. Així, a les cèl·lules epitelials han estat trobats nivells elevats de mRNA mentre que aquests nivells són moderats als fibroblats, baixos als macròfags, i molt baixos a les cèl·lules B (Doll i col., 1995). Aquestes diferències trobades en els nivells d'expressió semblen ser conseqüència de la disponibilitat de determinats factors que intervenen en la regulació del gen (OCTA binding protein, AP-1, PEA3 i CCAAT binding protein) (Moran i col., 1997).

## **5.2- EL GEN DE LA PROSAPOSINA**

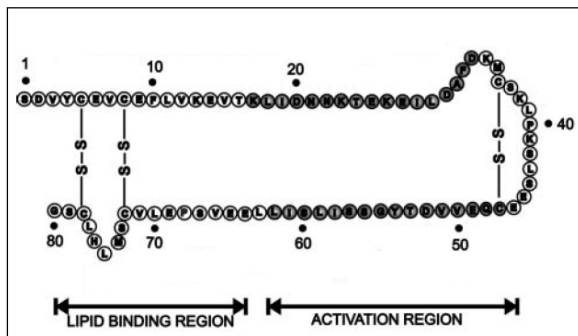
El gen *PSAP* va ser mapat al cromosoma 10 a la regió q21-22 (Inui i col., 1985; Kao i col., 1987). S'estén per unes 40 Kb, incloent la regió promotora i el primer exó (GenBank AF057307), i els 14 exons restants (GenBank M86181). El gen codifica per un proteïna de 524 aminoàcids que inclou el pèptid senyal i un polipèptid que és processat mitjançant talls proteolítics específics (Leonova i col., 1996) donant lloc a quatre glicoproteïnes d'uns 80 aminoàcids, les saposines A, B, C i D.

La saposina C (SAP-C), proteïna activadora de la  $\beta$ -glucosidasa àcida, és un membre de la família de les saposines (Kishimoto i col.,



1992; Vaccaro i col., 1999; Qi i Grabowski, 2001; Schuette i col., 2001). Totes elles mantenen una elevada identitat contenint sis residus cisteïna en posicions quasi idèntiques, els quals intervenen en la formació de tres ponts disulfur (figura 18). Aquests ponts permeten que les saposines siguin estructuralment compactes i molt estables (Kishimoto i col., 1992; Vaccaro i col., 1999; Qi i Grabowski, 2001; Schuette i col., 2001).

El manteniment d'aquesta estructura és essencial per l'estabilitat proteolítica i probablement pel manteniment d'altres propietats funcionals de les saposines (Vaccaro i col., 1999).



**Figura 18:** Seqüència aminoacídica de la SAP-C i localització dels seus ponts d'hidrogen (Qi i Grabowski, 2001).

La descripció d'un pacient amb la malaltia de Gaucher i nivells d'activitat normals per la GBA però amb deficiència en la proteïna activadora, SAP-C, va suggerir que aquesta tenia un paper important en l'activació de l'enzim *in vivo* (Christomanou i col., 1986; Christomanou i col., 1989).

### 5.3- MUTACIONS EN EL GEN *GBA*

L'any 1987 s'identificà la primera mutació responsable de la malaltia de Gaucher (Tsuji i col., 1987) i, fins el moment, s'han descrit prop de 200 mutacions diferents (<http://www.hgmd.org>), les quals poden ser mutacions de canvi de sentit, d'aturada prematura, recombinacions, insercions, delecions i canvis que afecten el lloc d'*splicing*. Algunes d'aquestes mutacions poden ser degudes a processos de recombinació entre el gen i el pseudogèn.

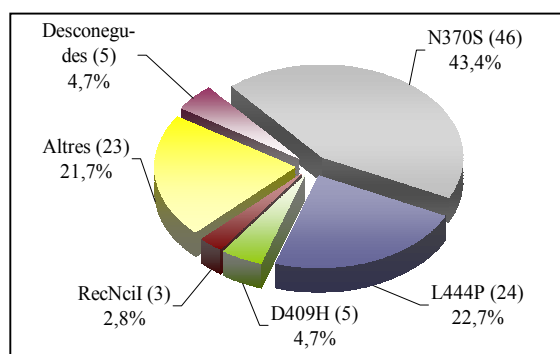
#### 5.3.1- PREVALENCIA

De les nombroses mutacions en el gen *GBA* causants a la malaltia de Gaucher, només dues es troben amb una elevada freqüència en totes les poblacions estudiades. Són la N370S, la L444P, (Beutler i Grabowski, 2001). Les mutacions 84GG, IVS2+1g>a, R463C, D409H i G377S també s'han trobat en diversos grups de poblacions amb la malaltia de Gaucher (Mistry i col., 1992; Cormand i col., 1995; Amaral i col., 1999).

Les mutacions N370S, L444P, 84GG, D409H, IVS2+1g>a i R463C representen aproximadament el 90% i 75% del total de mutacions observades en pacients amb la malaltia de Gaucher en població jueva i no

jueva, respectivament (Horowitz i col., 1993; Beutler i Gelbart, 1993).

Estudis sobre població espanyola revelen freqüències semblants a les d'altres poblacions, sent la N370S (43%) la més freqüent, seguida de la L444P (23%) (Cormand i col., 1995) (figura 19).



**Figura 19:** Freqüències relatives de les mutacions responsables de la malaltia de Gaucher en la població espanyola. Resultats de Cormand i col. (1995). En parèntesi, el nombre d'alels.

### 5.3.2- DATACIÓ: MUTACIÓ N370S

La importància de la mutació N370S degut a la seva elevada freqüència en les diferents poblacions estudiades ha fet possible l'estudi del seu origen.

S'ha comprovat l'existència d'un haplotip comú pels marcadors més propers al gen *GBA* en els cromosomes portadors de la mutació N370S (tant en els pacients espanyols com en els d'origen jueu asquenazi). Aquest fet recolza la hipòtesi d'un possible origen únic per a aquesta mutació. La datació de la mutació

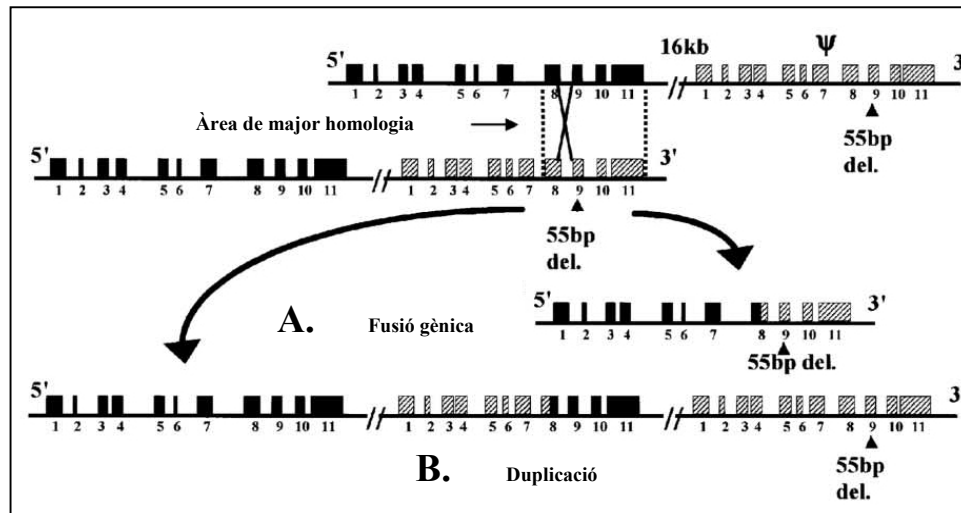
N370S en població jueva asquenazi ha estat estimada en uns 900 anys (Díaz i col., 1999; Colombo, 2000; Díaz i col., 2000).

El desequilibri de lligament és més elevat en la població jueva, fet que suggereix que la mutació s'originà en una població europea no jueva i, posteriorment, hauria passat a la població jueva. La separació entre jueus asquenazis i sefardis es produí abans de l'origen de la mutació, fet que explicaria perquè els darrers no presenten la N370S.

De moment, no estan clares les raons per les quals aquesta mutació presenta tant elevada prevalença. S'especula que podria ser degut a algun avantatge selectiu dels heterozigots o a la deriva genètica. Però fins el moment no es disposa de proves en cap sentit.

### 5.3.3- AL·LELS RECOMBINANTS (Recs)

Els al·lels recombinants (Recs) deuen el seu origen a les reordenacions produïdes entre gen i pseudogèn, sent les més freqüents les originades entre l'exò 8 i la zona 3' UTR, regió on la identitat entre ambdós és més elevada (~98%) (Tayebi i col., 2003) (figura 20). S'han descrit però, reordenacions a la zona 5' del gen, encara que amb menor freqüència. És el cas d'un pacient espanyol que presenta un gen de fusió on el punt del reordenació es troba a l'intró 2 (Cormand i col., 2000).



**Figura 20:** Entrecreuament recíproc entre regions homòlogues de gen i pseudogèn ( $\psi$ ) de la  $\beta$ -glucosidasa àcida, que pot donar origen a un gen de fusió (A) o a una duplicació parcial del gen i el pseudogèn (B). En caixes negres s'indiquen els exons del gen i en les grises els del pseudogèn (Tayebi i col., 2003).

L'al·lel *RecNciI* (L444P; A456P; V460V) és el més prevalent. En la població argentina analitzada representa un 21% dels al·lels responsables de la malaltia de Gaucher (Cormand i col., 1998c). La majoria d'aquests al·lels han estat originats per conversió gènica, i el seu origen podria estar associat a un efecte fundador (Díaz-Font i col., 2003a).

### 5.3.4- CODONS D'ATURADA PREMATURA I PROCÉS DE NMD

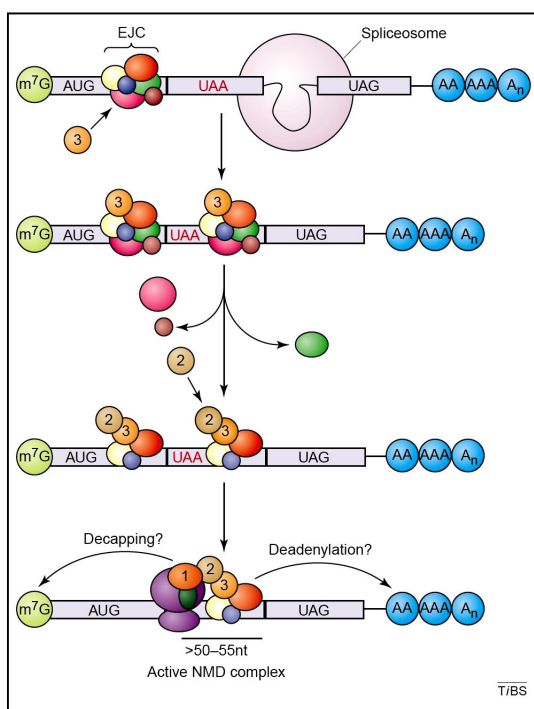
L'aturada prematura de la traducció de la  $\beta$ -glucosidasa àcida, així com d'altres proteïnes, pot ser deguda (i) a la presència d'un codó d'aturada situat abans del codó de finalització de la traducció (R257X, per exemple), (ii) a la presència d'una mutació que canvia la pauta de lectura (c.1451delAC), o (iii) a la presència d'una mutació que canvia el lloc d'*splicing*

provocant una deleció o inserció que donarà lloc a un canvi en la pauta de lectura i la generació d'un codó d'aturada prematur (IVS8(-11delC)(-14T>A), per exemple). En tots aquests casos, s'originarà una proteïna truncada, la qual pot no arribar a sintetitzar-se o formar-se'n molt poca degut al procés de NMD (*nonsense mediated mRNA-decay*).

L'NMD és un complex mecanisme de vigilància de l'RNA missatger, descrit en cèl·lules eucariotes. Impedeix la síntesi i l'expansió de proteïnes truncades (Maquat, 2002). L'origen d'aquestes es pot deure a: (i) errors introduïts per la RNA polimerasa, (ii) al procés normal d'obtenció de les zones hipervariables de les immunoglobulines, (iii) a la creació de transcrits importants per a la regulació d'un enzim (Hillman i col., 2004), o (iv) a mutacions presents en un gen, com les anteriorment comentades en aquest apartat.

Per al reconeixement dels transcrits que contenen codons d'aturada prematurs (PTCs),

aquests han de trobar-se a una distància no inferior a 50-55 pb cap a 5' de la unió exó-exó situada més a 3' (Cheng i col., 1994; Zhang i col., 1998; Nagy i Maquat, 1998; Maquat, 2002) (figura 21).



**Figura 21:** Model del procés de NMD (Singh i Lykke-Andersen, 2003). És necessària la presència d'un complex multiproteic (EJC) situat a uns 20-24 nucleòtids (nt) abans de cada unió exó-exó. La primera ronda de traducció elimina els EJCs del missatger. Si la senyal de traducció es troba abans d'uns 50-55 nt de la darrera unió exo-exó, o més cap a 5', aquest complex sistema de vigilància identifica la senyal d'aturada cop a prematura i, en conseqüència, es produeix la degradació del missatger.

La presència de PTCs en transcrits, que són posteriorment parcial o totalment degradats pel procés de NMD, es calcula que és la causant d'una tercera part de les malalties genètiques, incloent les malalties d'acumulació lisosòmica, així com de moltes formes de càncer (revisat per Frischmeyer i Dietz, 1999). En ocasions s'ha pogut determinar com l'eliminació d'aquests transcrits afecta el fenotip final dels

pacients que el contenen (Frischmeyer i Dietz, 1999; Culbertson, 2001).

En el cas de la malaltia de Gaucher són diverses les mutacions que causen l'aparició d'un PTC, però fins el moment no s'ha avaluat com el procés d'NMD afecta a la supervivència d'aquests transcrits ni quina conseqüència pot tenir sobre el fenotip dels pacients.

## 5.4- MUTACIONS EN EL GEN *PSAP* RESPONSABLES DE LA MALALTIA DE GAUCHER

Mutacions en el gen de la PSAP que afecten l'activitat de la proteïna activadora de la  $\beta$ -glucosidasa àcida (la SAP-C) són responsables també de la malaltia de Gaucher.

L'existència d'un pacient amb una evident acumulació de glucosilceramida, coherent amb el diagnòstic de malaltia de Gaucher, però amb activitat glucocerebrosidasa normal, va fer pensar que era un bon candidat per a ser deficient en la SAP-C (Christomanou i col., 1986).

La primera mutació descrita en aquest pacient fou identificada a l'any 1991, en la posició 1144 del cDNA. És un canvi d'una T per una G que provoca un canvi d'aminoàcid, C382G (taula 7). La segona mutació d'aquest pacient ha estat identificada recentment per Díaz-Font i col·laboradors (manuscrit en preparació). És la Q430X i es troba situada al domini D de la PSAP. La presència d'aquest codó d'aturada

prematura podria ser responsable de l'eliminació del transcrit resultant mitjançant el procés de l'NMD i, en conseqüència, la manca total de les quatre saposines. Aquest fet estaria d'acord amb dades prèvies que demostren una reducció del 50% en el nivell d'mRNA produït pel gen *PSAP* en la mare d'aquest pacient.

**Taula 7:** Mutacions responsables de la malaltia de Gaucher en el gen de la prosaposina. La numeració del cDNA comença a partir del codó d'iniciació.

MUTACIONS PSAP		
cDNA	Canvi aa	Referència
1 A>T	M1L	Schnabel i col., 1992
1144 T>G	C382G	Rafi i col., 1993
1145 G>T	C382F	Schnabel i col., 1991
1288 C>T	Q430X	Diaz-Font i col., manuscrit en preparació

Es va identificar un segon pacient en el qual la malaltia de Gaucher també és deguda a la deficiència en la SAP-C. Una de les mutacions trobades en aquest pacient es troba en el mateix codó que en l'anterior però en la posició 1145. És el canvi d'una G per una T (Schnabel i col., 1991). La segona, es troba en l'A de l'ATG d'iniciació de la traducció, comproment totalment la síntesi de la PSAP i, per tant, provocant la manca de les quatre saposines resultants: A, B, C i D (Schnabel i col., 1992). Han estat descrites altres mutacions en el gen *PSAP*, però que provoquen la deficiència en altres o en totes les saposines i que, per tant, donen lloc a altres malalties (leucodistrofia metacromàtica i deficiència total en PSAP).

## 6- PREVENCIÓ GENÈTICA

### 6.1- DIAGNÒSTIC PRENATAL

El diagnòstic prenatal de la malaltia de Gaucher pot ser realitzat a partir de teixits fetsals fàcilment assequibles, com són els amniòcits, les vellositats coriòniques o les cèl·lules cultivades procedents d'ambdues.

La necessitat d'un diagnòstic prenatal apareix en aquelles famílies que presenten algun antecedent amb la malaltia.

El diagnòstic, com hem vist amb anterioritat, pot ser realitzat per mètodes enzimàtics i/o moleculars. En el darrer cas, caldrà conèixer les mutacions causants de la malaltia en la família subjecta a estudi o, en cas contrari, emprar marcadors altament polimòrfics per a realitzar un diagnòstic indirecte (Cormand i col., 1998b). Només en alguns dels casos en els quals s'arribi a identificar el genotip del fetus, serà possible determinar el tipus de la malaltia.

### 6.2- CONSELL GENÈTIC

L'anàlisi mutacional pot ser emprat per a la identificació de portadors i afectes en famílies amb elevat risc de patir la malaltia de Gaucher o en poblacions que tenen una elevada

incidència de la mateixa, com en el cas de la població jueva asquenazita.

El consell genètic presenta, però, moltes dificultats a causa tant a la marcada heterogeneïtat al·lèlica com de la diferent resposta de cada pacient a la teràpia que se li subministra.

A partir del genotip és possible conèixer, en alguns casos, quin serà el tipus de la malaltia. És cas de les mutacions L444P i N370S. Per al cas de la primera, es coneix que la seva presència, en homozigosi, es troba generalment associada amb les formes neuronopàtiques de la malaltia i que en canvi, la segona, tant en homozigosi com en heterozigosi, promou una evolució de la malaltia que no anirà mai associada amb les formes neuronopàtiques (revisat per Beutler i Grabowski, 2001).

Malgrat això, dintre de cada tipus així com entre persones amb el mateix genotip, la heterogeneïtat fenotípica és molt elevada (Cox i Schofield, 1997), amb excepció dels pacients amb tipus II, els quals tenen un curs de la malaltia més homogeni.

Els pacients que presenten el tipus I de la malaltia de Gaucher són susceptibles de rebre teràpia de reemplaçament enzimàtic. Aquest fet dificulta en major mesura el consell genètic per al cas d'un diagnòstic prenatal, degut a que a la marcada heterogeneïtat fenotípica present en el tipus I (de asimptomàtic a sever) caldrà sumar-li la variació en la resposta que experimenta cada pacient davant del tractament enzimàtic.

---

## 7- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

La mesura de l'activitat enzimàtica de la glucocerebrosidasa realitzada a partir d'extractes cel·lulars revela la manca de correlació entre els nivells d'activitat residual mesurada i el tipus de la malaltia o la severitat.

A partir dels anàlisis genètics ha estat possible determinar algunes correlacions genotip-fenotip, tot i que, en molts casos l'encavalcament de les manifestacions clíniques entre pacients que presenten diferents genotips fa molt difícil determinar la prognosi de la malaltia en un pacient determinat.

Fins el moment, s'han arribat a establir unes poques correlacions genotip-fenotip detallades a continuació.

### 7.1- TIPUS I

Els pacients amb almenys un al·lel c.1226G>A (N370S) no presentaran afectació del sistema nerviós i, per tant, tindran el tipus I de la malaltia.

Tsiju i col. (1988) varen ser els primers en descriure aquesta mutació, la més prevalent en pacients Gaucher. Aproximadament, el 90 % dels individus N370S/N370S presenten el fenotip més lleu de la malaltia i molts d'ells són asimptomàtics (Zimran i col., 1989;

Zimran i col., 1991; Sibille i col., 1993). En els heterozigots, la segona mutació condiona la severitat dels símptomes.

Existeixen també altres mutacions menys freqüents associades amb el tipus I, com la I402T i la V375L (Cormand i col., 1997b).

## 7.2- AFECTACIÓ NEUROLÒGICA

Els pacients homozigots per la mutació L444P presenten una clínica més severa, generalment associada amb manifestacions neurològiques i, per tant, amb la malaltia de tipus II (Stone i col., 2000) i de tipus III (Koprivica i col., 2000). Els primers símptomes apareixen sempre molt aviat, i el marge de variació fenotípica és més reduït que en el cas de la mutació N370S. Existeixen, però, algunes excepcions. És el cas de diversos pacients japonesos homozigots per la mutació L444P que no han arribat a manifestar aquests símptomes (Masuno i col., 1990). Aquests resultats, però, han estat rebutats per (1999a) i col·laboradors, els quals afirmen que la manca de manifestacions neurològiques pot ser deguda a un diagnòstic temprà de la malaltia o, en determinats casos, al possible efecte protector o retardant que el tractament de reemplaçament enzimàtic o de trasplantament de medul·la òssia produïa haver tingut (Ida i col., 1999a). Existeix, però, un pacient de 30 anys amb aquest fenotip sense manifestacions neurològiques, tot i que desconexim si es

troba sota tractament enzimàtic (Hatton i col., 1997).

En pacients de tipus II, la mutació L444P ha estat trobada sola, en combinació amb la E326K i com a part de l'al·lels recombinants (Stone i col., 2000).

Han estat diverses les mutacions trobades en combinació amb aquest al·lel en pacients afectats per les formes neuronopàtiques, entre les quals es troben les següents: 84insGG, IVS2+1G>A, c.754T>A (F213I) i c.1297G>T (V394L). Segons Koprivica i col. (2000), l'al·lel c.1448T>C (L444P), quan es troba acompanyant un al·lel nul provoca sempre un fenotip de tipus II, mentre que en homozigosi seria més freqüent trobar-lo en pacients amb el tipus III. La influència del segon al·lel sembla ser, per tant, essencial per a l'edat d'aparició de les manifestacions neurològiques.

Els pacients Gaucher amb el tipus Norrbottnian són tots homozigots per aquesta mutació i, per regla general, presenten la malaltia de Gaucher tipus III amb severitat variable (Dahl i col., 1990).

## 7.3- FORMA LETAL PERINATAL

L'homozigositat per al·lels Rec dona com a resultat la forma letal perinatal (Stone i col., 2000; Tayebi i col., 2003). Existeixen però, nombroses variants genotípics molt heterogènies que provoquen, com a conseqüència, aquest fenotip. L'activitat

enzimàtica d'aquestes variants s'espera que sigui nul·la.

## 7.4- FORMA ATÍPICA AMB IMPLICACIÓ CARDIOVASCULAR

Pacients homozigots per l'al·lel D409H presenten una forma atípica del tipus III de la malaltia de Gaucher, caracteritzada per manifestacions cardiovasculars com esclerosi vascular i oclusió aòrtica severa (Chabás i col., 1995; Abrahamov i col., 1995; Bohlega i col., 2000).

---

## 8- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTANTS

La identificació de les mutacions causants de la malaltia de Gaucher i el seu estudi funcional en sistemes eucariotes permet obtenir informació sobre les bases moleculars de la malaltia així com establir relacions entre l'estructura de l'enzim mutat i la seva activitat residual.

Són diversos els estudis realitzats en aquest sentit, amb l'ús de diferents sistemes d'expressió i diferents tipus cel·lulars (Grace i

col., 1990; Ohashi i col., 1991; Grace i col., 1994; Choy i col., 1996; Kim i col., 1996; Pasmanik-Chor i col., 1996a; Grace i col., 1999; Amaral i col., 2000; Torralba i col., 2001; Hodanova i col., 2003). Algunes de les mutacions expressades i els seus resultats es mostren a la taula 8.

Els diferents autors analitzen diverses mutacions, però la majoria d'ells coincideixen en l'estudi de les mutacions més prevalents, la N370S i la L444P.

### *N370S (c.1226G>A)*

La N370S és la mutació més prevalent. Ha estat sempre associada, tant en homozigosi com en heterozigosi, amb la forma no neuronopàtica de la malaltia de Gaucher. Gran part dels individus que presenten el genotip N370S/N370S presenten un fenotip lleu i molts d'ells són asimptomàtics (Zimran i col., 1989; Zimran i col., 1991; Sibille i col., 1993).

Amb la recent resolució de l'estructura de la proteïna s'ha pogut determinar que l'Asn370 es troba a l'hèlix  $\alpha$ -7 situada a la interfase entre el domini II i III, allunyada, per tant, del centre actiu (Dvir i col., 2003).

Per tot això, esperaríem que els nivells d'activitat residual de la proteïna portadora de la mutació N370S fossin elevats. En canvi, els resultats obtinguts en els diferents estudis mostren que presenta valors d'activitat intermedis i que en alguns casos poden ser fins i tot baixos.



**Taula 8:** Mutacions expressades en diferents estudis sobre l'activitat de l'enzim GBA (activitat en % respecte a la proteïna salvatge).

REFERÈNCIES	Ohashi i col., 1990	Grace i col., 1994	Choy i col., 1996	Kim i col., 1996	Pasmanik-Chor i col., 1996a	Grace i col., 1999	Amaral i col., 2000	Torrallba i col., 2001	Hodanova i col., 2003
Sistemes d'expressió	Plasmid/ NIH 3T3	Bacul./ Sf9	Bacul./ Sf9	Bacul./ Sf9	Vaccinia virus/ HeLa-CV1	Bacul./ Sf9	Bacul./ Sf9	Plasmid/ COS-1	Plasmid/ Fibroblast
V15L				14					
F109V							5,2		
D140H						51,1			
D140H+E326K						19,8			
G202R								17	
G202E									3
E233X						0			
G325W								14	
E326K						60,1		26	
T369M									40,4
N370S	4,5	25,9-7,3	23,3	13	12,3	23,9	8,2	18	9,3
G377S							4,5	18	
P391L								9	
V394L		18,8-2,5							
D409H					12,4				5,5
L444P		4,8-1,4	3,3		18,1	3,9	2,7	3	5,4
E326K+L444P						3,5			
R463C	37,7	35,8-10,1						24	

### ***L444P (c.1448T>C)***

S'identificà per primera vegada en un pacient de tipus II (Tsuji i col., 1987) i, més tard, es trobà en pacients amb altres tipus clínics. Els pacients que contenen la mutació L444P han de ser examinats per excloure que es tracta de pacients amb un genotip Rec, el qual es podria correspondre amb la presència d'un al·lel nul.

La L444P es troba a la seqüència normal del pseudogèn.

Com ja hem comentat, ha estat associada amb els tipus II i III de la malaltia de Gaucher, fet que fa pensar que els nivells d'activitat específica de la proteïna mutada haurien de ser inferiors als obtinguts per la mutació N370S. Els resultats ens mostren nivells d'activitat baixos, però que en alguns casos no presenten

diferències significatives respecte els valors d'activitat de la N370S.

### ***D409H (c.1342G>C)***

La mutació D409H, a l'igual que la L444P, es troba de forma normal a la seqüència del pseudogèn. Com ja hem comentat, en homozigosi, es troba associada a una forma atípica del tipus III de la malaltia de Gaucher, fet que fa pensar que la seva activitat *in vitro* hauria de ser bastant baixa.

Els resultats obtinguts per diferents autors mostren, però, que els nivells d'activitat *in vitro* són semblants o lleugerament inferiors als obtinguts per la mutació N370S.

**ALTRES**

Nombroses mutacions han estat expressades degut a la seva presència en determinades poblacions o a la seva presència en determinats punts de la proteïna (llocs de glicosilació). L'expressió d'algunes d'elles té o ha tingut un especial interès per tal de conèixer la seva relació amb la patogenicitat de la malaltia i saber, per tant, si es tracta de polimorfismes neutres o mutacions causant de la malaltia de Gaucher. Algunes d'aquestes mutacions són la D140H, la E326K, la T369M i la R463C, totes elles amb nivells d'activitat bastant elevats (taula 8). Les tres primeres han estat trobades únicament com a part d'al·lels complexos, fet que recolza la hipòtesi de que es podria tractar de polimorfismes neutres o de mutacions molt lleus (Grace i col., 1999; Park i col., 2002; Walker i col., 2003). La darrera, la R463C, ha estat descrita com a mutació causant de la malaltia de Gaucher malgrat el seu elevat valor d'activitat específica i les seves propietats catalítiques (Km i Ki), equivalents a les de l'enzim salvatge (Ohashi i col., 1991).

---

## 9- MODELS ANIMALS

El primer model animal de la malaltia de Gaucher es va trobar l'any 1979 de manera espontània en un gos (van de Water i col.,

1979), però no va ser propagat. Fou més tard, a l'any 1992, quan es desenvolupà el primer model murí amb la disrupció del gen de la glucocerebrosidasa (Tybulewicz i col., 1992). Els ratolins obtinguts, homozigots per un al·lel nul, presentaven una activitat glucocerebrosidasa inferior al 4%, i morien dintre de les primeres 24 h de vida.

Més tard, es procedí a modificar la seqüència del gen murí amb la introducció de mutacions puntuals (Liu i col., 1998). La presència del triple mutant L444P+A456P+V460V, al·lel considerat letal en humans (Strasberg i col., 1994; Sidransky i col., 1996b), provocà en els ratolins l'acumulació de glucosilceramida al cervell i al fetge. Aquesta acumulació, en canvi, no va arribar a ser detectable en els ratolins homozigots per la mutació L444P degut a la presència d'uns nivells d'activitat enzimàtica superior (20%). Ambdues mutacions provoquen la mort dels ratolins dintre de les 48 hores de vida, aparentment per problemes en la permeabilitat de l'epidermis (Liu i col., 1998).

Per tal d'evitar la mort prematura dels ratolins, es va procedir al desenvolupament d'un model amb la mutació L444P en homozigosi en combinació una mutació nul·la en heterozigosi per la glucosilceramida sintasa. Aquests ratolins visqueren més d'un any, sense mostrar acumulació de glucosilceramida però amb el desenvolupament d'un procés inflamatori, de causa desconeguda, en diferents teixits (Mizukami i col., 2002).

Recentment, han estat desenvolupats ratolins amb els genotips N370S/N370S, N370S/nul i

nul/nul, els quals han mort poc després del naixement (24 primeres hores) amb un fenotip equivalent al descrit amb anterioritat pels ratolins nul/nul i L444P/L444P (Tybulewicz i col., 1992; Liu i col., 1998). Per aquesta raó no ha estat possible un estudi exhaustiu de l'enzim ni de l'acumulació de substrat en aquests ratolins. En el mateix estudi, però, han estat desenvolupats ratolins amb els genotips V394L/V394L, V394L/nul, D409H/D409H, D409H/nul, D409V/D409V i D409V/nul, amb un període de supervivència de 58 a 78 setmanes (Xu i col., 2003). L'activitat residual de l'enzim GBA, per cadascun d'aquests genotips, s'ha comprovat que és més de 2 vegades superior al cervell (21-28%) que en altres òrgans (2,5-11%). Els valors d'activitat residual són inferiors al fetge i, curiosament, l'acumulació de cèl·lules Gaucher o de lípids és menor en ell (comparant amb la melsa i els pulmons). Aquest fet fa pensar en l'existència d'un llindar diferent en cada teixit, per a l'activitat de l'enzim i/o per l'acumulació de substrat.

No es detecta acumulació de glucosilceramida al SNC, ni s'observen manifestacions neuronopàtiques, fet que suggereix l'existència d'un processament posttraduccional diferent o un recanvi de la proteïna mutada inferior al cervell respecte a altres òrgans (Xu i col., 2003).

Aquests estudis han revelat l'existència de diferències histològiques i fenotípiques en la malaltia de Gaucher entre ratolins i humans. La diferència més clara la trobem en la letalitat que presenten els ratolins amb la mutació

N370S en homozigosi, mentre que en els humans la mateixa mutació dona lloc a un fenotip lleu o asimptomàtic en un 80-90% dels pacients. Malgrat aquestes diferències, els ratolins viables per la malaltia de Gaucher seran útils per l'estudi de la patofisiologia de la malaltia i per l'estudi de teràpies *in vivo*.

---

## 10- TERÀPIA

### 10.1- TERÀPIA DE SUPORT

Les primeres mesures desenvolupades per a pal·liar els símptomes de la malaltia de Gaucher consistien en teràpies de suport, mèdiques o quirúrgiques, que eren i són efectives per problemes específics.

L'esplenectomia és útil quan el creixement de la melsa comença a ser simptomàtic, interferint en el creixement i el desenvolupament dels pacients. Resulta eficient per al tractament de les trombocitopènies greus (Freud i col., 1998). Les lesions òssies són moltes vegades alleujades o subsanades mitjançant pròtesis, les quals han de ser específiques per a cada pacient depenent de la dimensió de la lesió. També resulta útil l'administració de substàncies que inhibeixen la reabsorció òssia (bifosfonats, com el Fosamax) inhibint l'acció dels osteoclasts (Bembi i col., 1994; Samuel i col.1994).

Totes aquestes mesures així com altres es basen en pal·liar els símptomes però no curen als pacients perquè no resolen el problema primordial, la deficiència en l'enzim  $\beta$ -glucosidasa àcida.

## 10.2- REEMPLAÇAMENT ENZIMÀTIC

Els primers treballs encaminats a la l'obtenció d'una teràpia de reemplaçament enzimàtic daten dels anys 70 (Brady i col., 1974). Del d'aleshores fins a l'actualitat han estat diversos els intents desenvolupats en aquest sentit fins a l'obtenció final d'una teràpia de reemplaçament enzimàtic (TRE).

La TRE es basa en l'administració de l'enzim  $\beta$ -glucosidasa àcida lleugerament modificat per tal que pugui incorporar-se als macròfags i actuar en la degradació dels glucocerebròsids acumulats.

Actualment existeixen dos fàrmacs disponibles: (i) l'aglucerasa (Ceredase®, Genzyme Corporation, Cambridge, Massachusetts) aprovat l'any 1991, d'origen placentari i semisintètic i, (ii) l'imiglucerasa (Cerezyme®, Genzyme Corporation) aprovat l'any 1994, d'origen sintètic i produït per enginyeria genètica.

El primer s'obté de la  $\beta$ -glucosidasa àcida placentària humana i, posteriorment, és modificada amb l'eliminació de radicals glucídics per tal de mantenir residus manosa

exposats, els quals seran reconeguts pels macròfags per a la incorporació de l'enzim. Aquest enzim té 497 aminoàcids i el seu contingut en carbohidrats és del 6 % (un 12 % en l'enzim natural) (Wiltink i Hollak, 1996).

L'imiglucerasa es produeix per enginyeria genètica i es troba també modificada per a mantenir els residus manosa exposats.

S'ha demostrat que la TRE preveu les manifestacions sistèmiques de la malaltia de Gaucher en els pacients de tipus I, amb una millora de l'anèmia (normalització als dos anys), la trombocitopènia, els dolors ossis, les crisis òssies i l'organomegàlia (disminució del 20-30% a l'any o dos anys) (figura 22). S'observa també l'estabilització d'alguns problemes neurològics o fins i tot petites millores, com en l'espasticitat, l'atàxia o l'epilèpsia. Així, la teràpia de reemplaçament enzimàtic sembla ser efectiva en el tipus I i en menor mesura en el tipus III, però ineficaç en el tipus II.

La resposta de cada individu al tractament és difícil de preveure degut a que l'expressió clínica de la malaltia és molt variable.

Alguns pacients poden arribar a desenvolupar anticossos contra l'enzim administrat, i en un petit nombre de casos aquests anticossos poden tenir efectes neutralitzadors, que poden provocar efectes clínicament adversos sobre la teràpia enzimàtica. És per això, que els pacients tractats cal que siguin sotmesos a una estreta monitorització per tal d'observar si pateixen un empitjorament fisiològic en el seu desenvolupament al llarg del tractament i, així, tractar de solucionar-ho. Aquesta resposta

humoral deguda a l'administració de l'enzim recombinant ha estat també observada en el tractament de pacients amb altres malalties lisosòmiques com la MPS I o la malaltia de Fabry (revisat per Brooks i col., 2003).



**Figura 22:** Pacient que presenta una important millora en la visceromegàlia després de sotmetre's a la teràpia de reemplaçament enzimàtic.

La resposta a la teràpia de reemplaçament enzimàtic pot ser mesurable amb l'ús de marcadors bioquímics (quitotriosidasa, adenosin desaminasa, fosfatasa alcalina específica d'os, piridolina, telopèptids), clínics (volum de fetge i melsa), radiològics (afectació esquelètica) i hematològics (trombocitopènia, anèmia).

Degut a la variabilitat dels marcadors bioquímics, al solapament entre els nivells normals i patològics, i als ritmes circadians d'alguns d'ells, encara no poden ser recomanats amb absoluta certesa pel seguiment dels pacients sotmesos a tractament. Cal tenir en compte també, que per exemple la quitotriosidasa, l'activitat de la qual disminueix amb l'inici de la teràpia, no sembla incrementar els seus nivells d'activitat amb

l'empitjorament de la progressió de la malaltia ocasionada pel desenvolupament d'anticossos neutralitzant (Zhao i col., 2003).

Les dosis més usuals per als pacients de tipus I són: "dosis altes/baixa freqüència" (60 U/Kg/2 setmanes), "dosis intermèdies/baixa freqüència" (30 U/Kg/2 setmanes) i "dosis baixes/alta freqüència" (2,3 U/Kg/3 cops per setmana). Es desconeix quina és la dosi mínima eficaç però, fins el moment, aquesta sembla estar subjecta a cada pacient. Per al cas de pacients amb hipertensió pulmonar, són necessàries dosis elevades, degut a que el nivell d'alliberament de l'enzim administrat és menor als pulmons que en altres òrgans (Mistry i col., 1996). Per als pacients de tipus III, es recomanen les dosis més elevades (de 240-120 U/Kg/2 setmanes fins a 60 U/Kg/2 setmanes) i la millora es dona de forma molt lenta i mai en l'afectació neurològica.

L'administració de la teràpia de reemplaçament enzimàtic és produeix sempre per via intravenosa, fet que provoca la dependència dels pacients a algun servei hospitalari. Però la principal limitació estriba en l'elevat cost del tractament, especialment en països en vies de desenvolupament.

### 10.3- TERÀPIA DE REDUCCIÓ DE SUBSTRAT

L'ús d'imino sucres inhibidors de la glucosilceramida sintasa, la qual catalitza el primer pas en la formació de la majoria de

glucoesfingolípid (GSL), pot ser útil en la reducció de la taxa de síntesi dels mateixos fins a nivells on l'activitat residual de l'enzim inhibit sigui suficient per tal de prevenir l'acumulació patològica dels lípids.

Aquesta aproximació està sent aplicada per al tractament dels models murins en les malalties de Sandhoff i Niemann-Pick C (Jeyakumar i col., 1999; Zervas i col., 2001) i, recentment, s'ha aprovat un medicament (Zavesca) en aquest sentit per al tractament de la malaltia de Gaucher tipus I lleu o moderada. El component actiu és un imino sucre anomenat miglustat o OGT 918 (*N-Butyldeoxynojirimycin*) (Cox i col., 2000; Lachmann i Platt, 2001; Heitner i col., 2002).

L'administració d'aquest medicament és oral, fet que representa un benefici pràctic i econòmic. Només es recomana en pacients en els quals la teràpia de reemplaçament enzimàtic resulta inadequada. Presenta un inconvenient, que és l'elevat nombre d'efectes secundaris que provoca (diarrea, pèrdua de pes, signes de polineuropatia), però el benefici que comporta és molt superior i, en un gran nombre de casos, aquests efectes acaben desapareixent al llarg del tractament.

Una segona molècula, la *N-butyldeoxigalactonojirimycin* (NB-DGJ), està sent estudiada com a un nou agent terapèutic. En ratolins s'han realitzat un petit nombre de proves clíniques, demostrant-se una reducció en la concentració de glucoesfingolípid sense els efectes negatius del miglustat. Aquest fet suggereix que podria ser més ben tolerat pels

pacients que no pas el miglustat (Pastores i Barnett, 2004).

## 10.4- TRASPLANTAMENTS DE MEDULLA ÒSSIA

Els pacients amb un fenotip més sever de la malaltia (tipus III) poden beneficiar-se del trasplantament de medulla òssia (Ringden i col., 1995). Amb ell poden aconseguir-se nivells enzimàtics suficients per aturar el curs normal de la malaltia i, fins i tot, la millora en certs aspectes com la visceromegàlia, però no s'ha observat millora en les lesions òssies (Hoogerbrugge i col., 1995).

Els riscos associats al trasplantament de medulla òssia són molt elevats deguts a la pancitopènia, la immunodepressió i el rebuig. Tot i tenir grans avantatges (és una teràpia permanent que no obliga als pacients a estar sotmesos a continues infusions de l'enzim i és més econòmica) va associada a una elevada mortalitat, fins i tot quan el donant és totalment compatible (Brady i col., 1993).

## 10.5 - TRANSFERÈNCIA GÈNICA

Una gran varietat de cèl·lules han estat emprades en el desenvolupament de diferents estratègies de teràpia gènica, com són els

fibroblasts, hepatòcits, cèl·lules endotelials, queratinòcits, cèl·lules musculars llises i mioblasts. Per al cas de la malaltia de Gaucher, la gran majoria de les estratègies de teràpia gènica desenvolupades van encaminades cap a la introducció del gen de la  $\beta$ -glucosidasa àcida en les cèl·lules mare hematopoiètiques CD34+ procedents de la medul·la òssia o de sang perifèrica. Aquestes cèl·lules poden ser mobilitzades de manera eficient (amb l'administració de Neupogen), modificades *ex vivo* amb la incorporació del gen salvatge per mitjà de vectors retrovirals (com el MFG-CG), i els clons que expressen l'enzim poden ser seleccionats i reintroduïts al mateix pacient (Ohashi i col., 1992; Xu i col., 1994; Nimgaonkar i col., 1994; Dunbar i col., 1996; Havenga i col., 1997).

Actualment aquest tipus de teràpia gènica es troba en fase I. Els assajos clínics en 4 pacients, han donat com a resultat un benefici clínic a llarg termini (2 anys) únicament en 1 d'ells (revisat per Barranger i col., 1999).

Existeixen però altres estratègies, que fins el moment es troben en fase experimental sobre models animals o cèl·lules en cultiu. Algunes d'elles impliquen la sobre expressió de l'enzim normal en cèl·lules d'altres tipus cel·lulars, com mioblasts i fibroblasts. Els mioblasts han mostrat nombrosos avantatges des del punt de vista de l'expressió, secreció i alliberament sistèmic del producte transferit (revisat per Liu i col., 1997).

Una altra estratègia en desenvolupament, es basa amb l'ús dels anomenats quimeroplasts, oligonucleòtids quimèrics de RNA/DNA capaços de corregir una mutació puntual per mitjà del mecanisme de reparació de desaparellaments (Cole Strauss i col., 1996). Experiments fets a partir de fibroblasts i hepatòcits han demostrat que els quimeroplasts són capaços d'entrar en el nucli de les cèl·lules, però fins el moment no s'ha demostrat que la correcció pugui tenir lloc de manera eficient (Diaz-Font i col., 2003b).

