

El gen de la β -glucocerebrosidasa: un gen implicado en la enfermedad de Gaucher y en la hipoalfalipoproteinemia

A. Cenarro^a, P. Giraldo^b, J.I. Pérez Calvo^c y M. Pocoví^d

^aLaboratorio Investigación Molecular y ^bServicio de Hematología. Hospital Miguel Servet. Zaragoza.

^cDepartamento de Medicina y Psiquiatría y ^dDepartamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza.

Introducción

Las enfermedades lisosomales representan un grupo de más de 50 entidades que se caracterizan por la acumulación de lípidos complejos consecuencia del déficit de enzimas hidrolíticas, cofactores enzimáticos o defectos en mecanismos de transporte. Entre estas enfermedades la más frecuente es la enfermedad de Gaucher (EG). Su nombre se debe a que en 1882 el médico francés Philip Charles Ernest Gaucher describió al primer paciente con un cuadro clínico que recordaba un tumor de origen esplénico.

La EG es una enfermedad autosómica recesiva de depósito de material lipídico producida por una deficiencia de la enzima lisosomal β -glucocerebrosidasa (GBA) (glucosilceramidasa; EC 3.2.1.45)¹. Si bien afecta a sujetos de todas las razas, su prevalencia es mayor entre la población judía de origen ashkenazi, y la incidencia en la población no judía es de 1:100.000 personas². La EG se caracteriza por una amplia variedad clínica, desde niños gravemente afectados hasta adultos asintomáticos. La gran mayoría de pacientes presenta anemia y aumento de tamaño del hígado y el bazo, siendo el grado crítico de gravedad la afección del sistema nervioso central, que en muchas ocasiones conduce al fallecimiento de los pacientes. En relación con las características clínicas, se establecen tres tipos o variedades de EG (tabla 1). La diferencia más importante entre los tres es la presencia de manifestaciones neurológicas y la progresión de la misma. La variabilidad de los síntomas y signos de

la enfermedad es muy amplia, y se da la circunstancia de que pacientes con el mismo tipo de EG presentan síntomas distintos, sin existir una relación estricta entre la deficiencia enzimática y las manifestaciones clínicas.

El *locus* del gen de la GBA se encuentra situado en el cromosoma 1 en la región q21³. Se han descrito más de 120 mutaciones distintas en el gen de la GBA asociadas con la EG⁴. En un estudio se ha valorado la frecuencia de una de las mutaciones más habituales en este *locus*, asparagina por serina en posición 370 (N370S), en una población portuguesa; utilizando el equilibrio de Hardy-Weinberg, la homocigosidad para esta mutación sería de 1:55.000⁵. Dado que esta mutación supone aproximadamente el 50% de todas las mutaciones de la GBA, la estimación de la frecuencia de personas portadoras de alelos defectuosos de GBA sería de una cada 83.

Efectos de la acumulación de glucosilceramida

El sustrato natural de la GBA es el N-acil-esfingosil-1-O- β -D-glucósido (fig. 1). Este compuesto también se conoce con los nombres de glucosilceramida (Glu-Cer), ceramida- β -glucósido y glucocerebrósido, por lo que la GBA, enzima que hidroliza este sustrato, ha sido denominada como glucosilceramidasa, ceramidaglicosidasa o β -glucosidasa. La Glu-Cer se encuentra ampliamente distribuida en múltiples tejidos y en pequeñas cantidades como un metabolito intermediario de la síntesis y degradación de glucosfingolípidos, como los gangliósidos y globósidos, y como constituyentes de membranas. La glucosilceramida es el penúltimo intermediario en la ruta degradativa de los glucoesfingolípidos más complejos (fig. 2). La Glu-Cer procede fundamentalmente de la degradación de las membranas de las células hematopoyéticas y es retirada de forma preferente por los fagocitos mononucleares del sistema reticuloendote-

Correspondencia: Dr. M. Pocoví.
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular.
Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.
50009 Zaragoza.
Correo electrónico: mpocovi@posta.unizar.es

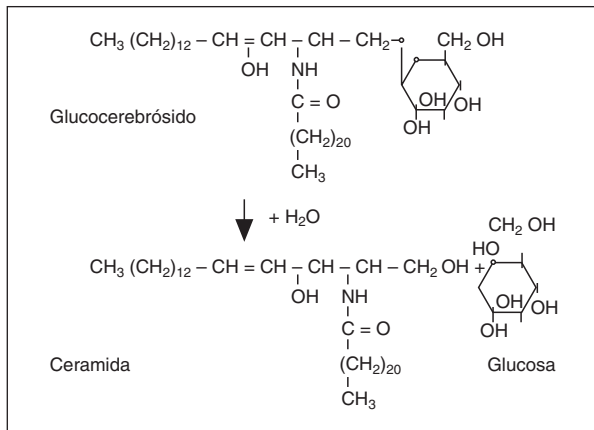


Figura 1. Reacción catalizada por la β -glucocerebrosidasa.

lial. La ausencia de actividad enzimática da lugar a una acumulación del sustrato, que en condiciones normales se elimina principalmente mediante los macrófagos del sistema monocito-macrófago¹. Las acumulaciones de células de Gaucher, que derivan de los macrófagos, en diversos órganos y tejidos (bazo, hígado, hueso, etc.) son los responsables de la sintomatología de la enfermedad.

Diversos autores han determinado la concentración de este glucocerebrósido, sustrato sobre el que actúa la glucocerebrosidasa, en plasma^{6,7} y en eritrocitos⁸ de pacientes con EG. Por término medio, la concentración de Glu-Cer se duplica en sujetos afectados clínicamente de EG en relación con sujetos controles, aunque en estos últimos hay una gran variabilidad en las concentraciones plasmáticas de este glucocerebrósido, y en algunos pacientes con EG tipo 1 no se observa una elevación significativa de Glu-Cer. Los pacientes que presentan afección neurológica (EG tipos 2 y 3) tienen una elevación de Glu-Cer más pronunciada que los pacientes tipo 1.

Son escasos los datos disponibles de valores de Glu-Cer en plasma o eritrocitos en pacientes some-

tidos a tratamiento enzimático sustitutivo (TES). En un estudio en el que se sometió a este tipo de tratamiento a 12 pacientes tipo 1, al cabo de un año se observó en nueve de ellos un descenso de la concentración plasmática de Glu-Cer⁹. Erickson et al⁸ han descrito el caso de un paciente con afección neurológica (tipo 2) en el que los valores de Glu-Cer se normalizaron después de 3 meses de TES con alglucerasa (Genzyme), aunque no se consiguió detener el deterioro neurológico. Este mismo grupo, recientemente, ha estudiado a pacientes tipo 3 durante el tratamiento con alglucerasa, y ha comprobado que se produce un marcado descenso de las concentraciones plasmáticas de Glu-Cer, por lo que proponen que su determinación en pacientes tipo 3 puede ser útil para monitorizar la dosis de enzima requerida¹⁰.

La acumulación patológica de lípidos en los monocitos actúa como un potente estímulo para la activación de los mismos, liberando factores séricos que ejercen efectos localizados y sistémicos sobre otras células linfoides. El exceso de Glu-Cer estimula la secreción de interleucina 1 (IL-1), un efecto que se encuentra sinérgicamente aumentado en presencia de lipopolisacáridos¹¹. Curiosamente, y a diferencia de los pacientes con enfermedades inflamatorias, los macrófagos de pacientes con la EG carecen de antígenos CD14 y CD11b, y se desconoce cómo afecta esta deficiencia de antígenos funcionales y su contribución al deterioro de la función inmune en los pacientes con EG¹². Por otra parte, los monocitos procedentes de pacientes con EG evidencian un significativo deterioro en la producción de anión superóxido en respuesta a estímulos de ésteres de forbol. El tratamiento *in vitro* de monocitos normales con Glu-Cer también afecta a la producción de anión superóxido, lo que sugiere que el deterioro de los monocitos de estos pacientes es consecuencia de la captación de Glu-Cer¹³. Todas estas observaciones sugieren que los macrófagos en pacientes con la EG están afectados de forma adversa por la exposición a elevadas cantidades de Glu-Cer.

Tabla 1. Clasificación clínica de la enfermedad de Gaucher

Manifestación	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3A	Tipo 3B	Tipo 3C
Edad de inicio	> 1 año	< 1 año	> 10 años	< 5 años	2-20 años
Visceromegalia	++	+/-	+/-	+++	+
Afección ósea	++	-	-	+++	-
Afección SNC	-	+++	+	-	+/-
Afección valvular cardíaca	-	-	-	-	+++
Apraxia oculomotora	-	+	+	+	+
Opacidad corneal	-	-	-	-	+
Edad fallecimiento (años)	60	< 3	< 20	30	< 20

SNC: sistema nervioso central.

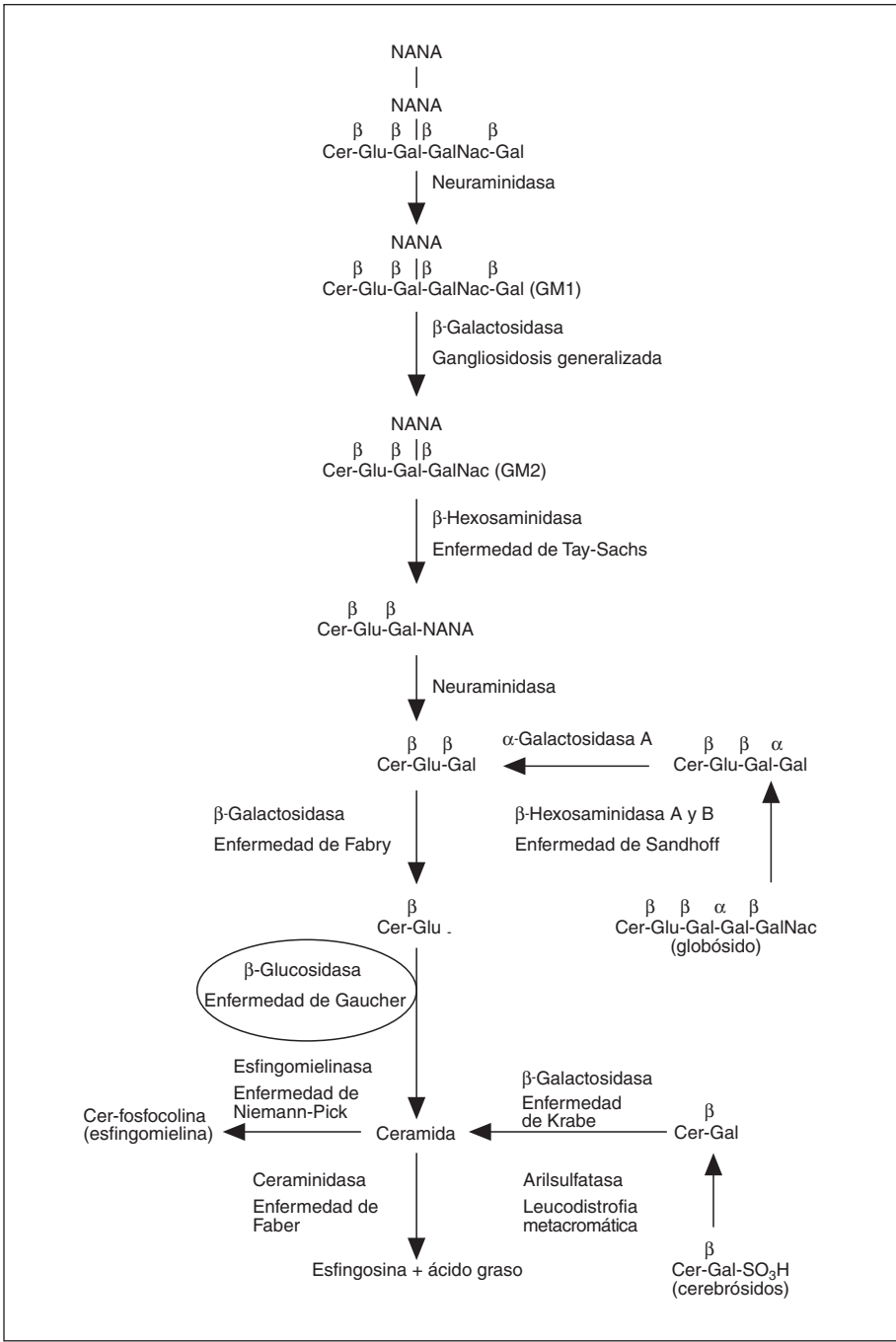


Figura 2. Rutas del catabolismo de los esfingolípidos por las enzimas lisosomales y enfermedades asociadas a deficiencias enzimáticas.

Efectos del déficit de GBA sobre las concentraciones de lípidos y lipoproteínas plasmáticas

Desde hace más de una década se sabe que los sujetos con EG tipo 1 tienen unas concentraciones plasmáticas disminuidas de colesterol total (CT), colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), y colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL)¹⁴. A pesar de que los sujetos con

EG tienen disminuido el CT, y como consecuencia del marcado descenso de cHDL, su índice aterogénico CT/cHDL es muy elevado. También se conoce que el grado de afección clínica de la enfermedad se correlaciona de forma inversa con los valores de colesterol en plasma. Por otra parte, la concentración de las apolipoproteínas (apo) AI y B también está disminuida en la EG. Sin embargo, la concentración plasmática de apo E, una proteína de 299 ami-

Tabla 2. Lípidos, lipoproteínas, apolipoproteínas y actividad de la glucocerebrosidasa (GBA) en pacientes con la enfermedad de Gaucher, portadores de un alelo mutante de GBA y no portadores

	Pacientes		Portadores		No portadores	
	Varones (n = 22)	Mujeres (n = 35)	Varones (n = 73)	Mujeres (n = 64)	Varones (n = 29)	Mujeres (n = 35)
CT	3,32 (0,98)	3,50 (1,06)	4,66 (0,98)	4,79 (1,11)	4,71 (0,98)	4,56 (0,83)
TG	1,59 (0,97)	1,52 (1,36)	1,15 (0,73)	0,93 (0,49)	0,85 (0,28)	0,81 (0,35)
cLDL	2,12 (0,78)	2,28 (0,91)	3,08 (0,85)	3,21 (0,98)	2,98 (0,96)	2,80 (0,75)
cHDL	0,59 (0,14)	0,66 (0,21)	1,02 (0,20)	1,16 (0,27)	1,31 (0,26)	1,42 (0,30)
cLDL/cHDL	6,10 (2,97)	5,80 (2,95)	4,34 (2,08)	3,70 (1,58)	3,04 (1,12)	2,60 (0,94)
APO A-I	0,81 (0,10)	0,83 (0,17)	1,18 (0,17)	1,27 (0,25)	1,31 (0,18)	1,34 (0,22)
APO B	0,70 (0,19)	0,71 (0,19)	0,87 (0,23)	0,86 (0,24)	0,84 (0,21)	0,81 (0,28)
APO E	0,20 (0,07)	0,19 (0,09)	0,12 (0,08)	0,12 (0,04)	0,12 (0,04)	0,15 (0,06)
GBA	1,1 (0,4)	1,1 (0,4)	7,8 (2,5)	7,1 (2,3)	11,5 (3,3)	10,0 (2,4)

Media (DE) expresados en mmol/l para CT, TG, cLDL, cHDL; en g/l para apo AI, apo B y apo E, y en actividad nmoles de 4-metil-umbelliferil-beta-D glucopiranosido/mg de proteína \times hora para GBA. (Reproducida con el permiso de *The Lancet*¹⁶.)

noácidos presente en varias lipoproteínas y secretada por distintos tipos de células, incluidos los macrófagos, está aumentada en la EG¹⁵.

Recientemente, nuestro grupo ha observado por primera vez que los sujetos portadores de un solo alelo defectuoso del gen de la GBA, que son asintomáticos en cuanto a manifestaciones clínicas típicas de la EG, presentan cifras disminuidas de cHDL y apo AI, y su índice aterogénico CT/cHDL se encuentra aumentado en comparación con el de los no portadores¹⁶ (tabla 2). Los resultados de este estudio sugieren que el gen de la GBA es uno de los genes responsables de la variabilidad genética de los valores de cHDL en la población general. Dada la alta frecuencia de portadores de alelos defectuosos en el gen de la GBA en las diferentes poblaciones (1-7%), las mutaciones en este *locus* pueden ser las responsables de la hipoalfalipoproteinemia en más del 2% de la población general, siendo por tanto, una de las causas genéticas más frecuentes de cHDL descendido. Además, hemos observado que la frecuencia combinada de las dos mutaciones más frecuentes del gen GBA, N370S y L444P, en sujetos no relacionados que presentan hipoalfalipoproteinemia aislada, es de 0,25, que dobla a la frecuencia estimada en población no judía. Por otra parte, una búsqueda genómica hecha en 52 familias procedentes del estudio de Framingham ha demostrado un ligamiento para cHDL bajo y un marcador situado en la misma región del gen de la GBA, en 1q21 ($p = 0,004$) (Ordovás JM, comunicación personal). Un hecho destacable es que en los sujetos portadores de un alelo defectuoso para el gen GBA no se observó un aumento significativo de apo E total ni en la fracción de las HDL¹⁶. Estas personas podrían estar relativamente protegidas frente a enfermedad coronaria a pesar de su perfil

lipoproteico aparentemente aterogénico, ya que no se ha visto que la frecuencia de enfermedad cardiovascular esté aumentada en los familiares en primer grado de pacientes con EG. La paradójica falta de asociación entre concentraciones bajas de cHDL y riesgo aumentado de enfermedad coronaria también se observa en sujetos portadores de la apolipoproteína AI Milan¹⁷. En esta dislipemia, así como en algunos casos de deficiencia de apo AI, se ha observado un aumento de la velocidad de catabolismo de apo AI, lo que refleja que el descenso de los valores de cHDL en estos casos está asociado a un aumento en el transporte reverso de colesterol. Le et al¹⁵ analizaron a dos pacientes con EG y demostraron que la hipocolesterolemia presente en esta enfermedad se asocia con un aumento de la velocidad de catabolismo de las HDL y de las LDL, lo que es indicativo de que estamos en presencia de una hipoalfalipoproteinemia producida por un aumento en el transporte reverso de colesterol.

Es muy probable que existan dos situaciones de hipoalfalipoproteinemia en las que el riesgo aterogénico sea diferente: las más frecuentes son aquellas en las que un cHDL bajo es indicativo de un transporte reverso de colesterol disminuido, y por tanto están asociadas a un riesgo aumentado de enfermedad coronaria, y en otros casos la hipoalfalipoproteinemia es un reflejo de un aumento en el transporte reverso de colesterol en cuyo caso no estaría asociada a enfermedad coronaria; así sucede con las hipoalfalipoproteinemias asociadas a EG, apo AI Milan¹⁷ y apo AI Zaragoza¹⁸, entre otras.

Cuando los macrófagos están en presencia de un exceso de colesterol responden sintetizando apo E¹⁹. Esta apolipoproteína se combina con fosfolípidos y colesterol libre de las membranas y forma una partícula de la clase HDL. Se ha visto que esta

partícula, denominada γ -LpE, es la fracción más efectiva de las HDL en transportar el exceso de colesterol de las células periféricas al hígado, único órgano capaz de metabolizar colesterol²⁰. El transporte reverse de colesterol depende de la disponibilidad de partículas que puedan llevarlo a cabo: HDL que contengan apo AI, LpAI, y HDL con un alto contenido de apo E, γ -LpE²⁰. Recientemente se ha demostrado, mediante experimentos con animales transgénicos, que la apo E sintetizada por los macrófagos es capaz de realizar el transporte reverse de colesterol desde el macrófago al hígado, permitiendo la regresión de la placa de ateroma²¹. Es posible que en la EG la retirada del material lipídico de los tejidos periféricos sea, en parte, efectuada por la fracción de las HDL rica en apo E, γ -LpE, tal como lo sugiere el hecho de que la concentración de apo E de las HDL esté aumentada en estos pacientes. Por tanto, cabe la posibilidad de que el riesgo cardiovascular en sujetos con EG pueda estar asociado con la variabilidad interindividual de γ -LpE. Por otra parte, la concentración plasmática de γ -LpE va a depender de factores genéticos: genotipo de apo E del paciente y nivel de expresión de la apo E²².

La mayor esperanza de vida de la población general en los países occidentales, y por tanto de la población heterocigota para defectos en el gen de la GBA, así como la de los enfermos con EG gracias al tratamiento enzimático sustitutivo, plantea la necesidad de estudiar los riesgos potenciales de otras enfermedades degenerativas que puedan potenciarse por la EG. La calcificación valvular descrita recientemente en varios casos de EG homocigotos para la mutación D409H hace pensar en una posible predisposición de algunas formas clínicas de EG a enfermedades degenerativas cardiovasculares^{23,24}. Si asociamos los trastornos lipídicos que encontramos en la EG, vemos que estos sujetos pueden tener una expresión diferente de la arteriosclerosis, principal enfermedad degenerativa en la población general.

Los estudios *in vitro* han demostrado que la glucosilceramida estimula la liberación de citocinas por los monocitos, lo que ha llevado a estudiar el posible papel de las citocinas en la EG²⁵. Las citocinas son moléculas que desempeñan un importante papel en la homeostasis, desarrollo y fisiopatología, por lo que alteraciones en su producción y/o secreción pueden tener importantes implicaciones en la fisiopatología de la EG²⁶. Los macrófagos activados y los linfocitos T son la principal fuente de citocinas; sin embargo, otras células, como los astrocitos y microglía, no las producen. La mayoría

de pacientes con la EG tienen elevaciones de las citocinas de macrófagos entre 2 y 8 veces; entre ellas se encuentra la denominada factor estimulante de macrófagos (M-CSF). Estos factores, junto con la IL8, se han estudiado en relación al grado de afectación de la enfermedad y en pacientes en tratamiento enzimático²⁷. No se observó ninguna correlación entre la gravedad de la EG, determinada según el índice de afectación SSI (*Severity Score Index*) y los valores de M-CSF, ni IL8²⁸. En pacientes con tratamiento con alglucerasa los valores de M-CSF disminuyeron, pero los de IL8 no se modificaron²⁷.

En un número significativo de pacientes con EG se han observado cifras aumentadas de inmunoglobulinas²⁹. Se sabe que determinados glucolípidos pueden presentar propiedades inmunogénicas bajo determinadas condiciones, pero no se conoce si se producen autoanticuerpos de Glu-Cer en la EG. Se sabe que se producen autoanticuerpos frente a otras moléculas que contienen lípidos, como las LDL oxidadas, y es razonable suponer que en la EG se produzcan autoanticuerpos frente a la Glu-Cer³⁰. En relación con las lipoproteínas, se conocen autoanticuerpos e inmunocomplejos frente a varias formas de LDL en numerosas situaciones clínicas, a menudo asociadas a anomalías en el metabolismo lipídico³¹. Los inmunocomplejos IgG son aclarados a través de receptores de células mieloides (Fc γ R), y se ha demostrado que la captación de inmunocomplejos LDL vía Fc γ R por parte de los macrófagos da lugar a captación de lípidos y transformación en células espumosas, lo que está asociado a un paradójico aumento de receptores LDL³². Por tanto, en relación con la EG es importante conocer si en los pacientes hay inmunocomplejos Glu-Cer, si estos complejos son aclarados vía receptores Fc γ R de los macrófagos, y si su presencia se correlaciona con la expresión de la enfermedad. Como consecuencia de la variabilidad estructural y funcional de los receptores Fc γ R y el grado de expresión de cada tipo de células mieloides, el aclaramiento de inmunocomplejos a través de Fc γ R es particularmente complejo. Hay como mínimo tres clases de Fc γ R y ocho isoformas, algunas de las cuales producen diferencias funcionales interindividuales³³. No se sabe todavía si la captación de la Glu-Cer por parte de los macrófagos es dependiente de receptores específicos o se realiza por pinocitosis no específica. Levade et al³⁴ demostraron que en células linfoides la ruta específica de captación de esfingomielina es la del receptor LDL. Parece ser que mecanismos mediados por receptores similares pueden existir en los macrófagos³⁵. El Fc γ R puede actuar como una ruta adicional de cap-

tación de Glu-Cer en el contexto de complejos autoinmunes de IgG-Glu-Cer. La detección en pacientes de EG de autoanticuerpos frente a Glu-Cer sería sugestivo de que un mecanismo mediado por el Fc γ R puede ser importante en la mayor o menor expresión de la enfermedad.

La quitotriosidasa como marcador de macrófagos activados

La arteriosclerosis se inicia por la infiltración de monocitos en el espacio subendotelial y la subsiguiente acumulación de lípidos en los macrófagos activados. El mecanismo molecular implicado en este comportamiento anómalo de los macrófagos en la arteriosclerosis sólo se conoce parcialmente. Las quitinasas son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar quitina, y se encuentran distribuidas en una gran variedad de especies no vertebradas, incluidas bacterias, peces, hongos, insectos, nematodos y plantas³⁶. Se creía que los mamíferos no poseían enzimas con actividad de quitinasa^{37,38}; sin embargo, hace unos años se identificó una enzima con actividad de quitinasa en humanos, la quitotriosidasa (QT)³⁹. Recientemente, se han identificado en humanos otras proteínas de la familia de las quitinasas: oviductina (gluproteína específica del oviducto humano), y la glucoproteína de cartílago humano (HCgp39)^{40,41}. A diferencia de la QT, no se conoce que estas otras proteínas tengan actividad enzimática, y en la actualidad su función se desconoce.

La QT ha despertado interés por diversas razones. Por una parte, esta enzima es secretada en grandes cantidades por los macrófagos cargados de lípidos en los pacientes que padecen la EG³⁹. Aumentos menos espectaculares de actividad plasmática de QT se han descrito en enfermedades granulomatosas o infecciosas como la sarcoidosis o la leishmaniasis⁴². Esta enzima puede ser útil para evaluar la eficacia terapéutica de los pacientes con la EG; se ha descrito que la actividad de la QT en pacientes con la EG desciende rápidamente cuando son sometidos a tratamiento enzimático sustitutivo^{39,43}, y que el trasplante de médula ósea en estos pacientes produce una normalización de la actividad quitinasa si el injerto ha concluido con éxito⁴⁴.

Aproximadamente entre un 6 y un 8% de la población carece de actividad plasmática de quitotriosidasa^{39,45}. Esto es debido a la herencia autosómica recesiva de un alelo nulo del gen de la QT. Este gen ha sido clonado y se conoce la base molecular de la deficiencia hereditaria de actividad de QT^{46,47}. El defecto molecular responsable de que el gen de la QT no produzca proteína con actividad de quitinasa consiste en una duplicación de 24 pares

de bases en el exón 10; esta duplicación da lugar a la aparición de una junta aceptora de ajuste *splicing*, que genera un ARNm con una delección en pauta de 87 nucleótidos⁴⁷. Todos los sujetos con deficiencia total de quitotriosidasa estudiados hasta la fecha son homocigotos para esta duplicación. La frecuencia de sujetos portadores, que es de alrededor de un 35%, indica que esta mutación es causa predominante de la deficiencia de QT. La presencia de esta duplicación en sujetos de diversas etnias sugiere que la mutación tiene un origen muy primitivo⁴⁷.

Se ha especulado que la QT humana podría estar implicada en la defensa y degradación de patógenos que contienen quitina, tales como hongos, nematodos o insectos. Sin embargo, su función, si es que la posee, no está aclarada. La función de las otras proteínas de la familia de las quitinasas que carecen de capacidad para hidrolizar quitina también se desconoce. Algunas de ellas, como la HCgp39, se expresan en asociación con los procesos de remodelado⁴⁸. La QT es secretada en grandes cantidades por los macrófagos activados³⁹ y, como su actividad se detecta fácilmente en plasma circulante, se considera un buen indicador de la cantidad de macrófagos activados. Prueba de ello es que en los estados en que se produce una activación de los macrófagos, como EG, leishmaniasis, sarcoidosis, tuberculosis, y betatalasemia, se producen elevaciones de la actividad plasmática de la QT^{39,42}. La expresión de HCgp39 en macrófagos de sangre periférica está asociada con las últimas etapas de la diferenciación de monocitos a macrófagos^{49,50}, y es uno de los principales productos de secreción de los condrocitos articulares y células sinoviales⁴⁸. Se ha apuntado que la HCgp39 desempeña un papel como autoantígeno en la artritis reumatoide⁵¹ y que es un marcador potencial de la fibrosis en pacientes con cirrosis alcohólica⁵².

Recientemente se ha descrito que estas dos proteínas homólogas de la familia de las 18 glicosil hidrolasas, la QT y la HCgp39, son expresadas por los macrófagos de las placas arterioscleróticas humanas, de la arteria femoral, aorta, ilíaca, carótida y coronaria⁵³. Por otra parte, también se ha observado una marcada variación fenotípica en la expresión de ambas proteínas en los macrófagos presentes en la lesión aterosclerótica. Además, la actividad de la QT se encuentra elevada en más de 55 veces en los extractos de los tejidos con arteriosclerosis en comparación con el tejido vascular aparentemente normal.

Como hemos comentado, la transformación *in vitro* de macrófagos a células espumosas va acompañada por un aumento en la expresión de apo E¹⁹.

Tabla 3. Cambios en las concentraciones de lípidos, lipoproteínas, apolipoproteínas y quitotriosidasa en pacientes sometidos a tratamiento enzimático sustitutivo (TES) (n = 36) y sin tratamiento (n = 9)

	Basal	18 meses	% cambio	p*
CT (mmol/l)				
TES	3,25 (0,88)	3,43 (0,88)	+ 6	0,04
Sin TES	3,41 (0,57)	3,69 (0,70)	+ 6	NS
cHDL (mmol/l)				
TES	0,58 (0,21)	0,80 (0,25)	+ 36	< 0,0001
Sin TES	0,66 (0,13)	0,66(0,16)	NC	NS
TG (mmol/l)				
TES	1,72 (1,26)	1,40 (0,74)	- 25	NS
Sin TES	1,06 (0,46)	1,30 (0,51)	+ 22	NS
Apo AI (g/l)				
TES	8,1 (1,6)	9,5 (1,9)	+ 16	< 0,0001
Sin TES	8,9 (2,4)	9,0 (2,1)	NC	NS
Apo B(g/l)				
TES	6,9 (1,9)	7,0 (2,0)	NC	NS
Sin TES	7,0 (0,9)	7,0 (2,1)	NC	NS
Apo E total (g/l)				
TES	2,1 (0,8)	1,5 (0,5)	- 27	< 0,0001
Sin TES	2,0 (0,6)	2,1 (0,7)	NC	NS
Apo E-HDL (g/l)				
TES	1,3 (0,5)	0,9 (0,3)	- 30	< 0,0004
Sin TES	1,1 (0,4)	1,1 (0,4)	NC	NS
QT (mU/ml)				
TES	165 (119)	74 (63)	- 56	< 0,0001
Sin TES	154 (109)	162 (116)	+ 5	NS

NC: no cambio; NS: no significativo; QT: actividad de quitotriosidasa. *ANCOVA para medidas repetidas. Media (DE). (Reproducida con el permiso de *The Lancet*⁴³.)

Por otra parte, la espectacular acumulación de macrófagos repletos de lípidos que ocurre en la EG va acompañada de un aumento de la concentración plasmática de apo E¹⁶. Además, en estos pacientes se observa una correlación altamente significativa entre la actividad de la QT y la concentración plasmática de apo E.

Efecto del tratamiento enzimático sustitutivo sobre las concentraciones de lípidos y lipoproteínas plasmáticas

El tratamiento enzimático sustitutivo en pacientes con la EG, mediante la GBA purificada de placentas o recombinante, restituye de forma parcial la actividad hidrolítica en los macrófagos y es efectivo en revertir las anomalías hematológicas y viscerales de los pacientes con esta enfermedad⁵⁴. Nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento enzimático sustitutivo en pacientes con la EG aumenta de forma significativa la concentración de cHDL y apo AI, sin producir cambios significativos en la concentración de cLDL y en apo B⁴³. Por otra parte, este tratamiento reduce la concentración total de apo E y la fracción de apo E asociada a las

HDL (tabla 3). Estos cambios probablemente sean consecuencia de que el tratamiento produce un descenso del número de macrófagos activados, como lo sugiere el hecho de que se produce un descenso concomitante en la actividad de la QT. Estos resultados indican que el tratamiento enzimático sustitutivo en pacientes con la EG tiene un efecto significativo sobre la estructura, concentración y metabolismo de las lipoproteínas, que da lugar a un perfil lipídico menos aterogénico.

Agradecimiento

Los datos de investigación original que se mencionan en el presente artículo han sido realizados en parte gracias a los proyectos FIS 99/0048-01 y FIS 00/0546.

Bibliografía

1. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. *The metabolic and molecular basis of inherited disease* (7.^a ed.). Nueva York: McGraw-Hill, 1995; 2641-2670.
2. Grabowski GA. Gaucher disease. *Enzymology, genetics, and treatment*. *Adv Hum Genet* 1993; 21: 377-441.
3. Shafit-Zagardo B, Devine EA, Smith M, Arredondo GAF, Desnick RJ. Assignment of the gene for acid betaglucosidase to human chromosome 1. *Am J Hum Genet* 1981; 33: 564.
4. Grabowski GA, Horowitz M. Gaucher disease: molecular, genetics and enzymological aspects. *Baillière's Clin Haematology* 1997; 10: 635-656.
5. Lacerda L, Amaral O, Pintó R, Oliveira P, Aerts J, Sa Miranda MC. Gaucher disease: N370S glucocerebrosidase gene frequency in the Portuguese population. *Clin Genet* 1994; 45: 298-300.
6. Nilsson O, Mansson JE, Hakansson G, Svennerholm L. The occurrence of psychosine and other glycolipids in spleen and liver from three subtypes of Gaucher's disease. *Biochim Biophys Acta* 1982; 712: 453-463.
7. Strasberg PM, Warren I, Skomorowski MA, Lowden JA. HPLC analysis of neutral glycolipids: an aid in the diagnosis of lysosomal storage disease. *Clin Chim Acta* 1983; 132: 29-41.
8. Erickson A, Johanson K, Mansson JE, Svennerholm L. Enzyme replacement therapy of infantile Gaucher disease. *Neuropediatrics* 1993; 24: 237-238.
9. Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-macrophage targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1464-1470.
10. Erikson A, Astrom M, Mansson JE. Enzyme infusion therapy of Norrbottnian type (type 3) Gaucher disease. *Neuropediatrics* 1995; 26: 203-207.
11. Scheibenbogen C, Andreesen R. Developmental regulation of the cytokine repertoire in human macrophages: IL-1, IL-6, TNF- α and M-CSF. *J Leukoc Biol* 1991; 50: 35-42.
12. O'Laughlin S, Braverman M, Smith-Jefferies M, Buckley P. Macrophages (histiocytes) in various reactive and inflammatory conditions express different antigenic phenotypes. *Hum Pathol* 1992; 23: 1410-1418.
13. Liel Y, Rudich A, Nagauker-Shriker O, Yermiyahu T, Levy R. Monocyte dysfunction in patients with Gaucher disease: evidence for interference of glucocerebrosidase with superoxide generation. *Blood* 1994; 83: 2646-2653.
14. Ginsberg H, Grabowski GA, Gibson JC, Fagerstrom R, Goldblatt J, Gilbert HS. Reduced plasma concentrations of total, low density lipoprotein and high density lipoprotein cholesterol in patients with Gaucher type I disease. *Clin Genet* 1984; 26: 109-116.
15. Le NA, Gibson JC, Rubinstein A, Grabowski GA, Ginsberg HN.

- Abnormalities in lipoprotein metabolism in Gaucher type 1 disease. *Metabolism* 1988; 37: 240-245.
16. Pocoví M, Cenarro A, Civeira F, Torralba MA, Pérez-Calvo JI, Mozas P. Beta-glucocerebrosidase gene locus as a link for Gaucher's disease and familial hypo- α -lipoproteinaemia. *Lancet* 1998; 351: 1919-1923.
 17. Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, Weisgraber KH, Maley RW. A-I Milano apoprotein: decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest* 1980; 66: 892-900.
 18. Recalde D, Cenarro A, Civeira F, Pocoví M. Apo A-I^{Zaragoza}: A novel mutation in the apolipoprotein A-I gene associated with familial hypoalphalipoproteinemia. *Hum Mutat* 1998; 11: 416.
 19. Basu SK, Ho Y, Brown MS, Bilheimer DW, Anderson RG, Goldstein JL. Biochemical and genetic studies of the apo E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem* 1982; 257: 9788-9795.
 20. Von Eckardstein A. Cholesterol efflux from macrophages and other cells. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 308-319.
 21. Linton MF, Atkinson JB, Fazio S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by bone marrow transplantation. *Science* 1995; 267: 1034-1037.
 22. Assmann G, Von Eckardstein A, Huang Y, Wu S. A lipoprotein containing only apo E is present in normal and HDL-deficient plasmas and releases cholesterol from cells. *International Symposium on Atherosclerosis*. Montreal. En: Woodford FP, Davignon J, Sniderman A, editores. *Atherosclerosis X*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1995; 662-665.
 23. Abrahamov A, Elstein D, Gross-Tsur V, Farber B, Glaser Y, Hadas-Halpern I. Gaucher's disease variant characterized by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet* 1995; 346: 1000-1003.
 24. Chabas AJ, Cormand B, Ginberg D, Burguera JM, Balcells S, Merino JL. Unusual expression of Gaucher's disease: cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation. *J Med Genet* 1995; 32: 740-742.
 25. Gery I, Zigler S, Brady RO, Barranger JA. Selective effects of glucocerebroside (Gaucher's storage material) on macrophage cultures. *J Clin Invest* 1981; 68: 1182-1189.
 26. Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N, Cox TM. Proinflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *Q J Med* 1997; 90: 19-25.
 27. Hollak CEM, Evers L, Aerts JMFG, Van Oers MHJ. Elevated level of M-CSF, CD14 and IL8 in type I Gaucher patients. *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23: 201-212.
 28. Zimran A, Kay A, Gelbart T, Garver P, Thurston D, Saven A. Gaucher's disease: clinical, laboratory, radiologic and genetic features of 53 patients. *Medicine (Baltimore)* 1992; 71: 337-353.
 29. Pratt PW, Estren S, Kochwa S. Immunoglobulin abnormalities in Gaucher's disease. *Blood* 1968; 31: 635-640.
 30. Salonen JT, Ylá-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R et al. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992; 339: 883-887.
 31. Beaumont JL, Doucet F, Vivier P, Antonucci M. Immunoglobulin bound lipoproteins (Ig-Lp) as marker of familial hypercholesterolemia, xanthomatosis and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1988; 74: 191-201.
 32. Griffith RI, Virella GT, Stevenson HC, Lopes-Virella MF. Low density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immunocomplexes. *J Exp Med* 1988; 168: 1041-1059.
 33. Fanger MW, Shen L, Graziano RF, Guyre PM. Cytotoxicity mediated by human Fc receptor of IgG. *Immunol Today* 1989; 10: 92-99.
 34. Levade T, Gatt S, Maret A, Salvayre R. Different pathways of uptake and degradation of sphingomyelin by lymphoblastoid cells and the potential participation of the neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1991; 266: 13519-13529.
 35. Morganeli PM, Guyre PM. Macrophage function and Gaucher disease. *Gaucher Clin Perspectives*. *Mol Med Therapeutics* 1995; 3: 1-5.
 36. Flach J, Plet P, Jolles P. What's new in chitinase research? *Experientia* 1992; 48: 701-716.
 37. Huberd M, Cabib E, Miller LH. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2807-2810.
 38. Raghavan N, Freedman DO, Fitzgerald PC, Unnasch TR, Ottesen EA, Nutman TB. Cloning and characterization of potential protective chitinase-like recombinant antigen from *Wuchereria bancrofti*. *Infect Immun* 1994; 62: 1901-1908.
 39. Hollack CEM, Van Weely S, Van Oers MHJ, Aerts JMFG. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994; 93: 1288-1292.
 40. Arias EB, Verhage HG, Jaffe RC. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biol Reprod* 1994; 51: 685-694.
 41. Hu B, Trinh K, Figueira WF, Price PA. Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 1996; 271: 19415-19420.
 42. Guo Y, He W, Boer AM, Wevers RA, De Bruijn AM, Groener JE. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disease. *J Inher Metab Dis* 1995; 18: 717-722.
 43. Cenarro A, Pocoví M, Giraldo P, García-Otín AL, Ordóvaz JM. Plasma lipoprotein responses to enzyme-replacement in Gaucher's disease. *Lancet* 1999; 353: 642-643.
 44. Young E, Chatterton C, Vellodi A, Winchester B. Plasma chitotriosidase activity in Gaucher disease patients who have been treated either by bone marrow transplantation or by enzyme replacement therapy with alglucerase. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 595-602.
 45. Aerts JMFG, Hollack CEM. Plasma and metabolic abnormalities in Gaucher's disease. *Baillière's Clin Haematol* 1997; 10: 691-709.
 46. Boot R, Renkema H, Strijland A, Van Zonneveld AJ, Aerts JMFG. Cloning of cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem* 1995; 270: 26252-26256.
 47. Boot R, Renkema H, Verhoek M, Strijland A, Blik J, De Meulemeester TM. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 1998; 273: 25680-25685.
 48. Hakala BE, White C, Recklies AD. Human cartilage gp39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of chitinase protein family. *J Biol Chem* 1983; 258: 25803-25810.
 49. Kirkpatrick RB, Emery JG, Connor JR, Doods R, Lysko PG, Rosenberg M. Induction and expression of human cartilage glycoprotein 39 in rheumatoid inflammatory and peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Exp Cell Res* 1997; 237: 46-54.
 50. Krause SW, Rehli M, Kreutz E, Schwarzfischer L, Paulauskis JD, Andreesen R. Differential screening identifies markers of monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* 1996; 60: 540-545.
 51. Verheijden GF, Rijnders AW, Bos E, Coenen-de Roo CJ, Van Staveren CJ, Miltenburg AM. Human cartilage glycoprotein 39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1115-1125.
 52. Johansen JS, Moller S, Price PA, Bendtsen F, Junge J, Garbarsch C. Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 582-590.
 53. Boot RTG, Van Achterberg TA, Van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJ, Aerts JM. Strong induction of member of chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 687-694.
 54. Grabowski GA, Leslie N, Wenstrup R. Enzyme therapy for Gaucher disease: the first five years. *Blood Rev* 1998; 12: 115-133.