

Libros de **Cátedra**

Enfermedades Metabólicas Hereditarias

Bases bioquímicas, moleculares, diagnóstico
y tratamiento

Ana Maria Cortizo (coordinadora)

FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS

e
exactas


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

ENFERMEDADES METABÓLICAS HEREDITARIAS

BASES BIOQUÍMICAS, MOLECULARES, DIAGNÓSTICO
Y TRATAMIENTO

Ana Maria Cortizo

(coordinadora)

Facultad de Ciencias Exactas



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA


EDITORIAL DE LA UNLP

Este libro está dedicado a nuestros alumnos, que con entusiasmo intentan comprender las bases de las enfermedades metabólicas hereditarias.

Agradecimientos

A los autores de este libro, docentes de Bioquímica Patológica, Ana Laura, Sara y Juan Manuel; a los colaboradores-docentes, Walter y Antony, por su tiempo y dedicación, que hicieron posible concretar este proyecto.

A Gabriel Giagante, por su colaboración en varias de las figuras de este texto.

A mis Profesores de Bioquímica Patológica, quienes me transmitieron el interés por diferentes aspectos de las Patologías hereditarias.

A la Facultad de Ciencias Exactas, por darnos el espacio de desarrollo para la docencia, investigación y extensión en el Área Bioquímica Clínica.

A la UNLP por crear este espacio de publicaciones para las Cátedras.

"Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender".

Marie Curie. (Nacida Marie Sklodowska). Científica francesa nacida en Polonia

Índice

PRIMERA PARTE

Introducción - Generalidades

Capítulo 1

Introducción. Bases genéticas, bioquímicas y moleculares de enfermedades metabólicas hereditarias _____ 10

Ana María Cortizo

Capítulo 2

Epigenética de Enfermedades humanas _____ 17

Ana María Cortizo

SEGUNDA PARTE

Cromosomopatías

Capítulo 3

Citogenética. Mecanismos de alteraciones cromosómicas _____ 24

Walter Bozzo

Capítulo 4

Síndrome de Down _____ 61

Ana Laura Di Virgilio

Capítulo 5

Síndrome de X-Frágil _____ 78

Sara Rocío Chuguransky

TERCERA PARTE

Alteraciones del metabolismo de Carbohidratos

Capítulo 6

Diabetes mellitus _____ 90

Ana María Cortizo y Antonio Desmond McCarthy

Capítulo 7

Síndrome metabólico _____ 132

Antonio Desmond McCarthy

Capítulo 8

Galactosemias _____ 140

Sara Rocío Chuguransky

Capítulo 9

Glucogenosis _____ 149

Juan Manuel Fernández

CUARTA PARTE

Alteraciones del metabolismo de Lípidos

Capítulo 10

Metabolismo de lipoproteínas y clasificación de Hiperlipoproteinemias.

Aterosclerosis _____ 165

Ana María Cortizo

Capítulo 11

Hiperquilomicronemias _____ 180

Ana María Cortizo

Capítulo 12

Hipercolesterolemia Familiar _____ 195

Ana María Cortizo

Capítulo 13

Enfermedades de almacenamiento lisosomal _____ 211

Ana María Cortizo

QUINTA PARTE

Alteraciones del metabolismo de Metales, Hemo y otras vías

Capítulo 14

Metabolismo de Fe - Hemocromatosis hereditaria _____ 236

Juan Manuel Fernández

Capítulo 15

Metabolismo del Hemo - Porfirias _____ 255

Sara Rocío Chuguransky y Juan Manuel Fernández

Capítulo 16

Alteraciones del metabolismo de la bilirrubina _____ 274

Juan Manuel Fernández

Capítulo 17

Alteraciones en el metabolismo de purinas _____ 289

Ana María Cortizo

Capítulo 18

Distrofias musculares _____ 307

Ana Laura Di Virgilio

Capítulo 19

Hiperfenilalaninemias – Fenilcetonuria _____ 327

Ana María Cortizo

Capítulo 20

Fibrosis Quística _____ 336

Ana María Cortizo

Capítulo 21

Osteopatías Hereditarias. Hipofosfatasa - Ontogénesis Imperfecta _____ 367

Juan Manuel Fernández - Ana María Cortizo

Capítulo 22

Enfermedades Neurodegenerativas. Alzheimer - Parkinson _____ 391

Juan Manuel Fernández

Los autores _____ 406

PARTE I

Introducción - generalidades

Ana M. Cortizo

El Proyecto del Genoma Humano (Human Genome Project, HGP), tuvo como objetivo secuenciar el genoma humano completo, se inició en 1990 y se completó en 2003. Uno de los resultados más sorprendentes fue el descubrimiento que solo el 2% de nuestro genoma está comprometido en la síntesis de proteínas, es decir, aproximadamente 20,000 genes codifican para ARN que se traducen en proteínas. A partir de estos descubrimientos, surgieron nuevos conceptos sobre la organización del genoma humano.

Sabemos también que cada persona presenta un perfil genético propio, caracterizado por variantes genéticas a lo largo del genoma. Como consecuencia los humanos difieren en un gran número de características, incluyendo aspectos relacionados con la salud y la enfermedad. Se descubrió que el riesgo de padecer una enfermedad, como consecuencia de una mutación, puede ser modificado por cambios en el ADN, de forma tal de regular la actividad de dichos genes. Se habla de variantes codificantes patogénicas (en genes que se traducen a proteínas) y de variantes que se encuentran en regiones reguladoras. La interacción de estas variantes puede alterar la penetrancia o expresión de una enfermedad, determinando el impacto de una mutación que causa enfermedad en unas personas y no en otras.

Estos conceptos demuestran la complejidad de las bases bioquímicas y moleculares sobre las que se basan las patologías humanas hereditarias.

El objetivo de este Libro sobre Enfermedades Metabólicas Hereditarias fue diseñar un texto actualizado para las actividades de la asignatura Bioquímica Patológica y la mejor formación de los alumnos de grado de la Carrera de Licenciatura en Bioquímica.

CAPÍTULO 1

Introducción. Bases genéticas, bioquímicas y moleculares de enfermedades metabólicas hereditarias

Ana M. Cortizo

Las Enfermedades Metabólicas Hereditarias (EMH), incluyen una serie de desórdenes en diversas vías metabólicas, debidas a mutaciones en un gen simple (mono génicas) o varios genes (multigénica) y que son heredadas en forma Mendeliana o no Mendeliana. Las mutaciones son la fuente de la variación y diversidad genética, algunas son patogénicas mientras que otras pueden no serlo. En realidad, hay múltiples factores que definen la expresión de una patología: el número de *loci* afectados, la contribución de cada alelo, así como la variación inter-individuo.

El desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha permitido definir la naturaleza del defecto en el material genético, caracterizando los procesos biológicos a nivel de proteínas y ácidos nucleicos y determinando como las alteraciones en estas macromoléculas interfieren con funciones de diferentes órganos y tejidos, originando así una patología. En 1996, se inició el catálogo de enfermedades Mendelianas, con información sobre 12.000 genes causantes de enfermedades, las mutaciones patogénicas y la relación fenotipo-genotipo.

Existen dos tipos de estrategias para identificar genes en enfermedades humanas: el clonado funcional y el clonado posicional. En el primer caso, el gen se puede aislar en base a la información sobre el producto proteico o su función. En el segundo caso, el aislamiento del gen comienza con el conocimiento de la localización genética o física en el genoma. El clonado posicional incluye la asignación de un gen en un cromosoma o parte de un cromosoma en particular; para esto existen varias metodologías, pero una de las más poderosas es el *análisis de ligamiento* (linkage analysis). Este análisis es un método que permite mapear genes de enfermedades que son detectables solamente como rasgos fenotípicos. La base de este análisis de ligamiento es que los eventos de recombinación entre dos *loci* génicos sobre el mismo cromosoma ocurren en una proporción relacionada a la distancia entre ellos. En el caso de *loci* que se encuentra muy cercanos en un cromosoma, se transmiten juntos prácticamente siempre y se dice que están fuertemente ligados. Pero cuando existe una cierta distancia entre dos *loci*, durante la meiosis se puede transmitir separados. Se define una fracción de recombinación (una medida de la distancia genética), que es la probabilidad de que la gameta producida sea recombinante. Se dice que dos *loci* se encuentran genéticamente ligados si la fracción de recombinación entre ellos es menor a 0.5.

En los últimos años ha habido proyectos liderados por grandes consorcios internacionales, como el Proyecto Genoma Humano, basado en los conocimientos de la secuencia completa del ADN humano, de las funciones asociadas y de la variabilidad genética. La información depositada en la base de datos pública facilita la rápida identificación del gen o genes que directa o indirectamente causan una enfermedad. Es posible también definir la relación entre variantes genéticas, arribar a un diagnóstico de enfermedades monogénicas o a la predisposición de enfermedades complejas o susceptibilidad a fármacos.

El concepto de *variante genética* implica que en el genoma existen pequeños cambios en la secuencia de ADN que hacen que no existan dos genomas humanos idénticos. Estas variantes pueden afectar la expresión de diferentes genes en los tejidos del organismo. A través del proyecto GETx, Expresión de genotipos en tejidos (*Genotype-Tissue Expresión Project*) del instituto de salud de EEUU, se investigó el efecto de variantes genéticas sobre la expresión de genes en 44 tejidos diferentes. Se concluyó que la mayoría de los genes, que ocupan aproximadamente el 2% del genoma, están regulados por variación genética localizada cerca del gen afectado. Los investigadores también encontraron que modificación pos traduccionales del ARN se hallan reguladas de forma dinámica y específica de tejidos y del estado de desarrollo del mismo. Estos estudios permitirán en el futuro, comprender las diferencias inter-individuo y mejorar las estrategias de tratamiento.

Debemos también considerar el concepto de *penetrancia*. El fenotipo es la expresión de un genotipo particular, sin embargo, el genotipo no siempre se expresa a través de un rasgo o fenotipo particular. La penetrancia establece la conexión entre genotipo y fenotipo. Podemos definir la **penetrancia** como la probabilidad de que un individuo con un dado genotipo exprese el fenotipo o simplemente la probabilidad de que se encuentre afectado (con una enfermedad).

Las enfermedades determinadas genéticamente pueden dividirse en cromosómicas, enfermedades monogénicas y enfermedades complejas o multifactoriales. Las enfermedades cromosómicas se hallan asociadas a parte o la totalidad de cromosomas (Parte 2 de este libro). La mayoría de las alteraciones cromosómicas son incompatibles con la vida y alrededor de la mitad aparecen en abortos espontáneos. En algunos casos, la expresión de la enfermedad y herencia puede depender de la contribución que hace alguno de los padres, es decir, si el rasgo se transmite a través de la línea materna o paterna. Este fenómeno de contribución genética diferencial de los progenitores hacia la descendencia se denomina *imprinting*.

Las enfermedades monogénicas son causadas por un alelo enfermo en un locus génico y se heredan en forma Mendeliana: autosómica dominante, autosómica recesiva o ligadas al cromosoma X (el gen afectado se localiza en el cromosoma X).

Por otro lado, las enfermedades complejas incluyen una amplia categoría de alteraciones, cuyo modo de herencia no puede definirse o también enfermedades donde se desconoce el defecto génico específico. La heterogeneidad genética y la posibilidad de causas no genéticas pueden contribuir a la complejidad de una enfermedad.

El diagnóstico de enfermedades genéticas incluye la consideración de la naturaleza hereditaria de dicha condición e involucra estudios familiares. Los métodos diagnósticos moleculares se

basan en la búsqueda de mutaciones asociadas a la enfermedad en cuestión, utilizando muestras de material genético del individuo afectado. Puede usarse muestras de sangre, impregnada en papel o sangre seca, así como otras que contengan el ADN genómico (vellosidades coriales, amniocitos, fibroblastos de piel, etc). Las técnicas se basan en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o RT-PCR según se trate de ADN genómico o ADNc (complementario) a partir de ARNm extraído del tejido donde se expresa el gen. Existen otras técnicas que también pueden usarse dependiendo del conocimiento del tipo de mutación asociada con la patología. En muchos casos, arribar al diagnóstico de una EMH puede ser muy difícil, dado que hay múltiples factores que lo dificultan. Uno de estos factores es la variabilidad clínica y bioquímica con que se manifiestan ciertas enfermedades. Las bases de dicha variabilidad es la *heterogeneidad genética* que se presenta en una población normal, debido principalmente a que no todas las mutaciones se asocian necesariamente con cambios funcionales en una proteína. Se trata de *polimorfismos* sin una consecuencia fenotípica. Además, existen eventos pos-traduccionales y regulatorios dependiente de la célula o tejidos donde se exprese el gen, que pueden modificar o no su funcionalidad, así como factores ambientales o Epigenéticos. En conclusión, el fenotipo clínico de una EMH puede ser modulado por múltiples factores.

Naturaleza y mecanismos de mutaciones

Las mutaciones son cambios en la secuencia del ADN, que son estables y heredables, más allá de su expresión fenotípica. Estos cambios en la secuencia primaria de nucleótidos son la base de las enfermedades, aunque en algunos casos pueden ser mutaciones benignas, es decir sin una consecuencia clínica. Se han descrito también mutaciones asociadas a la expansión de un triplete, o mutaciones dinámicas, lo cual significa que este tipo de mutaciones pueden no ser estables en las células somáticas o germinales. Desde un punto de vista evolutivo, las mutaciones permiten la adaptación a diversos factores del entorno mediante variaciones o diversidad genética, a través de mecanismos de selección natural.

Las mutaciones pueden ser muy diversas (Tabla 1), abarcando desde un genoma completo, como es el caso de las triploidias, donde se genera un cromosoma completo. También puede haber alteraciones en parte de un cromosoma, con deleciones, duplicación o translación de porciones del genoma. Por otro lado, las mutaciones pueden ser pequeñas y comprometer deleciones, inserciones o reemplazo de una base simple. Así tenemos *mutaciones puntuales*, cuando se reemplaza una base por otra; si la mutación ocurre en una secuencia codificante, tendremos un corrimiento en el marco de lectura, ya que se altera la lectura de los tripletes del código genético en el ARNm. En este último caso se produce una alteración en la secuencia de la proteína y normalmente una terminación prematura de la cadena peptídica debido a la aparición temprana de un codón de terminación. También pueden ocurrir deleciones o inserciones pequeñas que afecten la transcripción, *splicing* o procesamiento del ARN.

Tabla 1.1: Mecanismos de Mutaciones

Clase	Tipo	Efecto o consecuencia sobre la proteína
Puntuales	Silenciosa	Ninguno
	<i>Missense</i> o cambio de sentido	Cambia un aa por otro. Puede ser benigna, alterada o nula
	<i>Nonsense</i> o sin sentido	Sustitución de un aa por un codón de stop. Proteína Nula
	<i>Frameship</i> o error en el marco	Proteína Nula
	<i>Splicing</i> procesamiento de ARNm	Alteración en unión intron-exon. Proteína Nula o alterada
Grandes	Delección	Nula
	Inserción	Nula
	Duplicación	Nula o variable
	Inversión	Nula
	Expansión de Triplete	Nula o variable

Cuando ocurre el reemplazo de una base por otra, podemos tener tres situaciones. Una *mutación sinónima* o *silenciosa* (23 % de las sustituciones en la región codificante), en la que cambia el codón en el ADN pero codifica para el mismo aminoácido, con lo que no habrá cambios en la secuencia primaria de la proteína. En otro caso, tenemos una *mutación missense* o cambio de sentido (alrededor del 73% de las sustituciones de bases), en el cual el reemplazo de la base produce un cambio de un aminoácido por otro. En un tercer caso, el reemplazo de la base cambia de un codón para un determinado aminoácido a un codón de terminación, una *mutación nonsense* o sin sentido (4% de las sustituciones de bases en la región codificante del genoma). A veces, la sustitución de la base altera un sitio de *splicing* normal.

El tipo y frecuencia de ciertas mutaciones es una cuestión compleja, que en muchos casos depende o se asocia con el avance de la edad materna (por ej. Aneuploidia cromosómica) o en otros casos, el envejecimiento paterno. En determinadas enfermedades la alta frecuencia de mutaciones se asocia con el gran tamaño del gen, como en el caso de la Distrofia de Duchenne y el gen de la distrofina. Gracias a la disponibilidad de técnicas moleculares, como de ADN recombinantes, es posible determinar la naturaleza exacta de una mutación, o si es de origen materno o paterno, e inclusive analizar si se originó antiguamente o es reciente. Las mutaciones nuevas que ocurren en las células somáticas son eventos esporádicos en la población, pero pueden afectar al individuo que tiene dicha mutación, pudiendo o no pasarla a la descendencia. En caso de que la mutación ocurra en las células germinales, la expresión del gen mutante no se manifiesta en el individuo que lleva dicha mutación sino en las generaciones subsecuentes.

Varias proteínas pueden existir en dos o más formas y esto es posible debido a la existencia de múltiples variantes de un gen (*alelos*) en el mismo locus génico que codifica para la proteína. Cada individuo posee dos alelos, uno de cada padre, si los dos alelos son iguales, decimos que es *homocigota*, pero si son diferentes el individuo es *heterocigota* para dicho gen. Las diferencias entre los alelos se originaron durante la evolución a través de diferentes mutaciones. Sin embargo, en la mayoría de los casos la consecuencia de esto es una proteína igualmente funcional, es decir tenemos una mutación “neutra”.

Se habla de polimorfismo cuando las variantes de un alelo aparecen con una frecuencia <0.99 , pero pueden asociarse con una variante benigna o causar una enfermedad. Se sabe también que existe una gran variabilidad a nivel de la secuencia del ADN, 1:100 – 1:200 pares de bases es polimórfico en el genoma humano. Así, el ADN de cada individuo contiene millones de diferencias comparado con el ADN de otro, excepto en el caso de los gemelos idénticos.

Pesquisa Neonatal de enfermedades congénitas del metabolismo

La pesquisa de ECM es un sistema interdisciplinario de salud pública diseñado para la determinación masiva y universal y el posterior tratamiento precoz de enfermedades congénitas potencialmente catastróficas y difíciles de reconocer clínicamente en la población neonatal.

El objetivo del programa es identificar y tratar condiciones seleccionadas a efectos de eliminar o reducir la morbi/mortalidad y/o discapacidad asociada con determinadas enfermedades. No se propone implementar acciones terapéuticas, sino que frente a un resultado anormal se debe confirmar el diagnóstico mediante pruebas adecuadas a cada enfermedad.

Un aspecto importante a considerar son los criterios a utilizar para la selección de las patologías a investigar, ya que debe existir una relación costo-beneficio favorable que permita justificar su incorporación en el programa. Estos criterios fueron definidos por Wilson and Jungner y adoptados por la Organización Mundial de la Salud en 1968 (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Criterios de selección de Wilson y Jungner

	Criterio
1	La condición debe ser un importante problema de salud pública (daño grave e irreversible)
2	Debe haber un tratamiento aceptable para los pacientes con la enfermedad
3	Debe disponerse de recursos para el diagnóstico y el tratamiento
4	Debe haber un estadio latente o sintomático temprano conocido
5	Deben existir exámenes o pruebas de pesquisa adecuadas
6	Las pruebas deben ser aceptables para un estudio poblacional neonatal

7	Debe conocerse la historia natural de la enfermedad, desde el estado latente al manifiesto clínicamente
8	Debe haber políticas definidas sobre que pacientes deben ser tratados
9	Los costos de la detección (incluyendo diagnóstico y tratamiento de los pacientes diagnosticados) deben estar económicamente balanceados en relación a los posibles costos de la atención medica completa
10	La detección de casos debe ser un proceso continuo

Existe un panel básico de 7 enfermedades que pueden ser detectadas usando métodos clásicos de laboratorio, como se muestra en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3: Panel Básico de Pesquisa Neonatal

Enfermedad	Incidencia
Hipotiroidismo Canguenito	1 : 3.000
Fenilcetonuria	1 : 10.000
Galactosemia	1 : 60.000
Enfermedad de Orina de Jarabe de Arce (MSUD)	1 : 250.000
Hiperplasia Suprarrenal Congénita	1 : 10.000
Fibrosis Quística	1 : 3.000
Deficiencia de Biotinidasa	1 : 40.000

Existe además un Panel Ampliado que incluye enfermedades cuyo diagnóstico requiere métodos más complejos, como podría ser la espectrometría de masa en tándem (Tabla 1.4.), o medidas funcionales. También se incluyen enfermedades que aún no tienen una implementación general en todo el mundo y/o se han implementado recientemente.

Tabla 1.4: Panel Ampliado de Pesquisa Neonatal

	Enfermedad
•	Hemoglobinopatías
•	Deficiencia de G-6-PDH
•	Aminoacidopatías
•	Acidurias orgánicas
•	Defectos de la oxidación de ácidos grasos

•	Defecto de la audición
•	Retinopatía del Prematuro
•	Enfermedad Cardíaca congénita Crítica
•	HIV
•	Toxoplasmosis
•	Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID)
•	Enfermedades Lisosomales (Gaucher, Pompe, Nieman Pick A/B, Fabry, Krabbe, Mucopolisacaridosis I (MPSI))
•	Adrenoleucodistrofia (X-ALD)

La pesquisa neonatal ha avanzado extraordinariamente en los últimos años, debido al desarrollo de nuevas metodologías genéticas, y al desarrollo de nuevos tratamientos que cambien el curso de enfermedades raras en la niñez.

Referencias

- Borrajó GJC & Schenone AB. (2007). Pesquisa neonatal de los errores congénitos del metabolismo. En Fejerman – Fernández Alvares (eds) Neurología Padiátrica 3era Edición (pp. 189-194) Editorial Medica Panamericana.
- Chung E & Gardiner RM. Mapping human disease genes by linkage analysis. Cap 8. In Human Molecular Genetics. KW Adolph Ed. Academic press 1996.
- GTEEx Consortium, et al. *Genetic effects on gene expression across human tissues*. Nature. 2017 Oct 11;550(7675):204-213. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nature24277>.
- Rajavi F. (2018) Updates in newborn screening. *Pediatr Ann*. 47(5), e187-e190.
- Sanjurjo P & Baldellou A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 4ta. Edición. Ergon c Arboleda I 2014.
- Scriver CR et al. (Eds). The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw Hill, 2002.
- Wilson JMG, Jungner G. *Principles and practice of screening for disease*. Geneva: WHO; 1968. Available from: <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/4/07-050112BP.pdf>.

CAPÍTULO 2

Epigenética en enfermedades humanas

Ana M. Cortizo

Introducción

Generalmente consideramos que las enfermedades son debidas a mutaciones genéticas, polimorfismos y alteraciones cromosómicas, como factores promotores de una patológica. Pero además debemos considerar como un componente crítico la influencia de factores del entorno o ambientales, los cuales pueden regular la *actividad* del genoma (Fig 2.1). Así, podemos definir la *epigenética* como el estudio de cambios estables y heredables a nivel de la transcripción, en la expresión de genes, que no involucran alteraciones en la secuencia de bases del ADN. La definición de epigenética ha ido cambiando a medida que se conocieron más los diferentes mecanismos moleculares involucrados en estos fenómenos. En 1990, Holliday definió epigenética como “el estudio de los mecanismos de control temporal y espacial de la actividad de genes durante el desarrollo de un organismo complejo”. Actualmente Skinner et al han propuesto una definición más global que incluye todos los elementos moleculares involucrados, definiendo la epigenética como “los factores moleculares y procesos alrededor del ADN que son mitóticamente estables y regulan la actividad del genoma independientemente de la secuencia del ADN”.

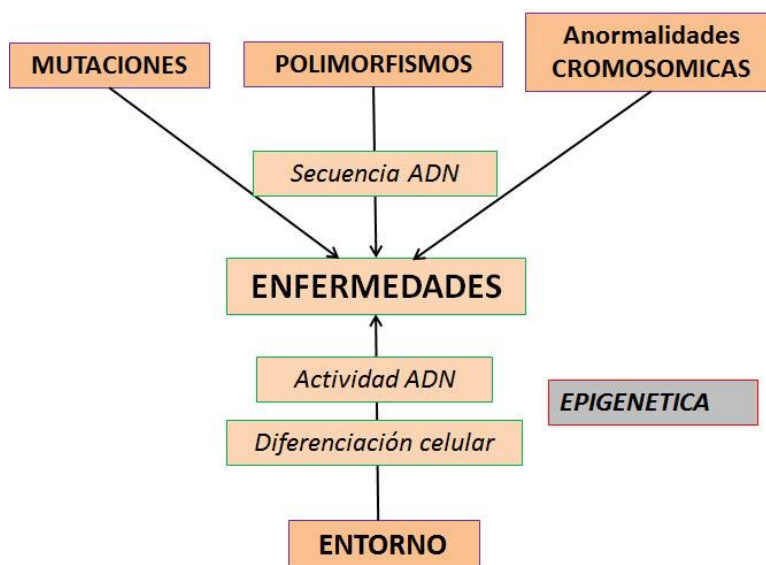


Figura 2.1. Factores promotores de Patologías

En la etiología de las enfermedades debemos considerar también la fase o estadio de desarrollo en que estos factores ambientales podrían actuar, como por ej. alteraciones en el programa de diferenciación de células y tejidos que se manifiesten en la vida adulta.

Existen diversos factores del entorno que pueden influenciar o promover enfermedades en la edad adulta, como por ej los nutricionales o el estrés. Pero en los últimos tiempos se ha resaltado el papel de los *disruptores endocrinos*. Estos son sustancias químicas que afectan la función del sistema endocrino simulando o bloqueando la acción de hormonas. Estos disruptores afectan de manera importante el desarrollo, debido al papel preponderante de las hormonas en el organismo.

El conocimiento de la contribución e interacción de factores genéticos y del entorno sobre el desarrollo de diversas enfermedades, podría ayudar a diseñar nuevas estrategias diagnóstica y de tratamiento para el manejo de estas condiciones.

Mecanismos Epigenéticos que regulan la expresión génica

Existen varios mecanismos a través de los cuales los factores del entorno pueden modificar la expresión de genes: Metilación del ADN; Modificaciones de Histonas; expresión de ARNs no codificantes pequeños (ncRNAs).

Metilación de ADN

Uno de los primeros mecanismos descritos de modificación epigenética fue la metilación del ADN en el contexto de la activación de genes durante el desarrollo. Este mecanismo es importante en la regulación de diversos procesos asociados con la fisiología humana y el desarrollo de enfermedades. Se ha estudiado en particular la metilación del ADN en el análisis de la inactivación del cromosoma X. Es esencial en el silenciado de uno de los dos cromosomas X en la mujer, asegurando de este modo la compensación de dosis génica. Además, este proceso es importante en la represión de elementos del genoma potencialmente inestables, tales como elementos de retrovirus.

Este mecanismo consiste en una modificación covalente que ocurre sobre restos de citosina dentro de dinucleótidos CpG. Estos CpGs se encuentran en gran medida localizados en islas en el extremo 5' de regiones regulatorias o regiones de promotores de diversos genes. Usualmente estas islas se encuentran no-metiladas, permitiendo así la transcripción génica, mientras que la metilación de las islas CpG en los promotores de un gen, lleva a que la cromatina se condense y la transcripción se vea reprimida. También puede ocurrir metilación de CpG en fragmentos intragénicos y regiones "*imprinted*". Los genes "*imprinted*" son una clase especial de genes en los que su patrón de metilación se mantiene estable y dicho patrón se establece tempranamente en la embriogénesis y se transmite así a través de generaciones. Los genes "*imprinted*" llevan

una memoria molecular de su patrón de origen alélico, adquirido tempranamente en la línea germinal y se mantienen en las células somáticas del individuo.

Las reacciones de metilación del ADN son catalizadas por enzimas denominadas metil transferasas (DNMT) que usan como donador S-adenosil L-metionina (S-AM) y unen covalentemente el grupo metilo en la citosina, produciendo como productos 5-metil citosina y S-adenosil L-homocisteina (S-AH) (Fig. 2.2). Se han identificado 5 DNMTs, cuatro de las cuales son isoformas activas (DNMT1, DNMT3a y 3b). Estas enzimas interactúan con deacetilasas de histonas (HDACs) y proteínas regulatorias de la cromatina tales como la proteína 2 de unión a CpG (MeCP2). Este proceso asegura la conexión entre la metilación del ADN, la modificación de histonas y el remodelado de la cromatina en la regulación de la expresión específica de genes.

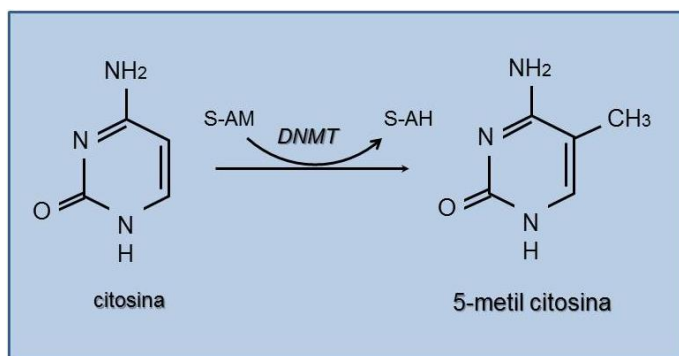


Figura 2.2. Reacción de metilación de la citosina en ADN. La enzima ADN metil transferasa (DNMT) transfiere un grupo metilo de S-adenosil L-metionina (S-AM) a la posición 5 de la citosina transformándolo en 5-metil citosina y el cofactor demetilado S-adenosil L-homocisteina (S-AH).

Existen diferentes métodos para analizar el grado de metilación del genoma (“metiloma”), y dado los avances tecnológicos, actualmente es posible un análisis a escala de genoma amplio con una resolución de pares de bases simples. Es posible identificar los sitios de ADN metilados usando *enzimas de restricción sensibles al grado de metilación*. Esta técnica requiere un ADN de alto peso molecular y está limitada al blanco de la secuencia específica de la enzima elegida. Una alternativa a esta metodología es la conversión de secuencias no-metiladas con *bisulfito*, seguido de la *amplificación por PCR* y *análisis de la secuencia*. Esta se considera la técnica “estándar de oro” para la detección de metil-citosinas. Esta técnica requiere una incubación prolongada del ADN con bisulfito de sodio, periodo durante el cual las citosinas no-metiladas en un ADN de cadena simple son deaminadas a uracilo. Las metil-citosinas son resistentes a este tratamiento, con lo cual se considera que las citosinas remanentes se encontraban metiladas. Este es un método muy utilizado y produce resultados de alta calidad y confiables. Actualmente se dispone de kits comerciales para estos estudios. Una limitación de esta técnica es que el tratamiento no puede discriminar entre metil-citosina y su forma oxidada, hidroximetil-citosina. También se puede realizar un análisis de metilación de alta resolución utilizando una combinación de hibridación genómica comparativa (CGH) y análisis de micro-arreglos (*microarray*). Los fragmentos de ADN metilados pueden purificarse por afinidad usando anticuerpos anti-metil-citosina o usando el dominio de unión al ADN de proteínas de unión a metil-CpG (*methyl-CpG-binding protein*). Es posible también realizar una combinación de metodologías, por ej. usar el tratamiento

con bisulfito y análisis de polimorfismo conformacional de ADN de cadena simple (SSCP) basado en PCR, en un ensayo para varias muestras y que es cuantitativo. Existen también métodos basados en la detección usando sondas fluorescentes de muestras amplificadas por PCR y métodos más específicos, para múltiples loci génicos como las técnicas de MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*).

Modificación de Histonas

En las células eucariotas, la cromatina, un complejo macromolecular de ADN e histonas, se organiza en forma de un nucleosoma. El nucleosoma está formado por 147 pares de base de ADN que envuelven un octámero de proteínas Histonas. El octámero de histonas está constituido por dos moléculas de cada una de las histonas H2a, H2b, H3 y H4. Las colas Nt de las histonas sobresalen del nucleosoma y constituyen una fuente de variabilidad, ya que pueden sufrir modificaciones pos-traduccionales. Entre dos nucleosomas consecutivos extendidos existe un fragmento de ADN, llamado ADN espaciador, que contiene una proteína histona adicional H1 (Fig. 2.3).

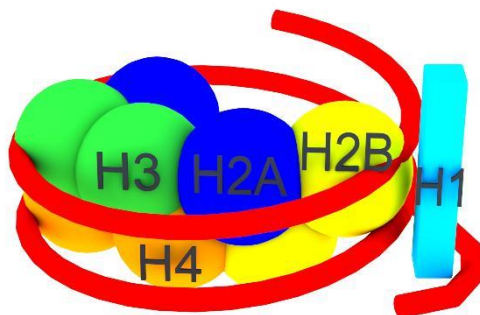


Figura 2.3. Estructura del nucleosoma. Dos vueltas de ADN se enrollan alrededor del octámero de histonas constituidos por dos subunidades de histonas H2A, H2B, H3 y H4. Una porción del ADN de conexión interactúa con la histona H1.

Las modificaciones de las histonas son coordinadas por varias enzimas que catalizan diversas modificaciones, algunas son activantes y otras inactivantes de la expresión génica. Entre las modificaciones activadoras tenemos la Acetilación (mediada por HAT, histona acetil transferasa), metilación de Arg o Lis (histona metil transferasa, HMT); otras son inactivantes o silenciadoras de genes como la deacetilación (vía histonas deacetilasas, HDAC) que usualmente se asocia con una compactación de la cromatina (heterocromatina). Sin embargo, la metilación de ciertas Lis (K9, K20, K27) en las histonas puede tener un efecto contrario, llevando a la inhibición de la transcripción. Por otro lado, existen agentes que modifican epigenéticamente el grado de acetilación de histonas, como los HDACis (inhibidores de las deacetilasas de histonas) que alteran el balance entre las HAT y HDAC, aumentando la acetilación, llevando a un aumento en la transcripción, y diversos efectos celulares sobre el crecimiento y diferenciación, angiogénesis y respuesta inflamatoria.

La modificación más importante de las histonas es la N-acetilación del residuo de Lis. Esta modificación neutraliza la carga positiva de la Lis debilitando la interacción electrostática entre las histonas y el ADN cargado negativamente. Por esta razón, la acetilación es un proceso usualmente asociado con una conformación de la cromatina más “abierta”. La acetilación es un proceso altamente dinámico regulado por la acción de dos tipos de enzimas, las Acetilinasas (HAT) y las deacetilasas (HADCs). Existe una familia de proteínas (*Readers*) que detectan el grado de acetilación de las Lis y que contienen un dominio o *motif* de unión conservado evolucionalmente llamado “bromodominio”. Estas proteínas funcionan como remodeladores de la cromatina. Varias de estas proteínas contienen también un dominio separado de “lectura de la cromatina” tales como los *PDH fingers* que reconocen modificaciones postraduccionales de las histonas.

Lo mismo ocurre para el proceso de metilación de las Histonas, sobre restos de Arg, Lis e His. La consecuencia de este proceso puede ser la activación de genes sobre la eucromatina o asociarse con heterocromatina en el genoma. Existen también proteínas “lectoras” de estas modificaciones que contienen diferentes *motif* o dominios de reconocimiento. Otro tipo de modificación de histonas es la fosforilación sobre restos de Ser, Thr y Tyr. Esta modificación altera la carga de la proteína, afectando sus propiedades iónicas y la interacción de la cromatina con el entorno. Este proceso es una modificación altamente dinámica y regulada por la acción de diferentes kinasas y fosfatasa.

Dado que la mayoría de las modificaciones de las histonas ocurren en el Nt, sería posible analizarlas usando el método de degradación de Edman. Sin embargo, este es un método laborioso que requiere tener la proteína en suficiente cantidad y con un alto grado de purificación. La espectroscopia de masas es el método de elección para el análisis de las modificaciones postraduccionales de las histonas, dado que cada modificación agrega una masa definida a la molécula.

ARN no codificantes (ARNnc)

Existe una serie de ARN que no se traducen en proteínas y pueden modificar la expresión génica. Los ARNnc se pueden definir como moléculas de ARN funcionales derivadas de transcritos intragénicos o *antisense* que no se traducen. Algunos de los mejor caracterizados son los micro ARN (ARNmi), ARN largos no codificantes (ARNlnc) y los ARN pequeños de interferencia (RNAsi).

Los ARNmi son moléculas muy pequeñas, entre 19-25 nucleótidos, difíciles de cuantificar ya que no precipitan adecuadamente con etanol cuando se usan los protocolos tradicionales de extracción con Trizol. Sin embargo, son mucho más estables que los ARNm, de tal forma que es posible detectarlos en muestras degradadas o en muestras de tejidos fijados y embebidos en parafina. Existen actualmente tres técnicas que pueden adaptarse para detectar y cuantificar los ARNmi en muestras tisulares: clonado del ARNmi, detección basada en PCR e hibridación con

sondas selectivas. También se han aplicado técnicas de “microarreglos” (*microarrays*) para cuantificar ARNmi. Esta técnica se basa en múltiples hibridaciones en paralelo usando un soporte de vidrio o cuarzo donde se deposita o sintetiza la sonda por un proceso fotoquímico.

Se ha demostrado que los ARNmi y ARNsi regulan la metilación del ADN e inducen silenciado de genes transcritos. Los ARNmi pueden actuar sobre las DNMT e inhibir su transcripción, alterando así la metilación global del ADN, o pueden actuar sobre genes “blanco” específicos alterando la estructura de la cromatina y/o la metilación del ADN. Los ARNsi pueden actuar sobre islas de CpG específicas dentro del promotor de un gen particular induciendo la metilación del ADN e histona H3, inhibiendo de esta manera la transcripción génica.

Por otro lado, los ARNlnc son ARNs largos (de más de 200 nucleótidos) que regulan la expresión de genes específicos en múltiples pasos: reclutamiento y expresión de la maquinaria de transcripción básica, modificaciones pos-traduccionales y epigenética. Los ARNlnc puede regular la homeostasis tisular bajo situaciones fisiológicas o patológicas. Se sabe que son capaces de interactuar con diferentes moléculas (proteínas, ADN, ARN, iones metálicos) para formar estructuras terciarias apropiadas para regular diversos procesos biológicos. De tal manera que los ARNlnc participan en la regulación de la expresión génica a través de varios mecanismos y a varios niveles, incluyendo el epigenético, transcripcional, *splicing* de ARN, transporte nuclear, pos-transcripcional, traduccional y pos-traduccional.

Referencias

- Hu G, Niu F, Humburg BA, Liao K, Bendi S, Callen S, Fox HS, Buch S. (2018) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs and their role in disease pathogenesis. *Oncotarget*. 2018 Jan 1;9(26):18648-18663.
- Schenkel LC, Rodenhiser D, Siu V, McCreedy E, Ainsworth P, Sadikovic B. (2017) Constitutional Epi/Genetic Conditions: Genetic, Epigenetic, and Environmental Factors. *J Pediatr Genet*. 2017 Mar; 6(1): 30–41.
- Skinner MK, Manikkam M, Gerrero-Bosagna C. (2010) Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab*. 21(4), 214-222.
- Trygve O. Tollefsbol. (Ed). *Epigenetics in human diseases*. Second edition. Academic Press. 2018.

PARTE II

Cromosomopatias

CAPÍTULO 3

Citogenética. Mecanismos de alteraciones cromosómicas

Walter Bozzo

Introducción a la Citogenética Clínica

Todos los caracteres de un individuo, desde la pigmentación de la piel a los componentes del corazón o del sistema nervioso, están controlados por uno o más genes que en conjunción con el medio ambiente, darán lugar al fenotipo del mismo. La gran mayoría de los genes están localizados en estructuras nucleares llamadas cromosomas, encontrándose un pequeño remanente en el ADN mitocondrial.

Los cromosomas son estructuras físicamente separadas (cada uno de ellos constituye una molécula) cuyo contenido de ADN varía entre 50 a 250 millones de pb según el tamaño del cromosoma. Cada uno contiene muchos genes, de unos cientos a miles en cada cromosoma. Estos comprenden cerca del 2% del genoma humano, el resto consiste de regiones no codificantes, cuya función puede incluir la de proveer integridad a la estructura cromosómica y la de regulación; es decir, donde, cuando y en qué cantidad las proteínas deberán ser sintetizadas. Las células humanas normales presentan 46 cromosomas, a excepción de algunos tipos celulares en determinados órganos. En las gametas el número cromosómico está reducido a la mitad.

Si pudiéramos extraer el ADN de una célula humana, unirlo y estirarlo, veríamos con sorpresa que su longitud es cercana a un metro. ¿Cómo puede la célula contener todo este ADN en su núcleo cuando el diámetro del mismo es alrededor de 10 a 20 micrones? Para ello, la naturaleza ha recurrido al empaquetamiento en distintos grados (Fig. 3.1). El máximo empaquetamiento se encuentra en el estadio de metafase de la división celular, que es cuando se los puede observar mejor a los cromosomas en el microscopio óptico. Aún en la interfase, donde los cromosomas están mucho más extendidos y difusos al microscopio, la doble hélice de 2 nm está sujeta por lo menos a dos grados de empaquetamiento.

La unidad fundamental de empaquetamiento es el nucleosoma, que consiste en un *core* de 8 proteínas histónicas alrededor de las cuales se enrollan 146 pb. Al microscopio electrónico se los observa unos unidos a otros como “cuentas de un collar”. En el segundo nivel de empaquetamiento la “cadena” de nucleosomas se enrolla en forma de espiral tomando el aspecto de un solenoide (fibra de 30 nm).

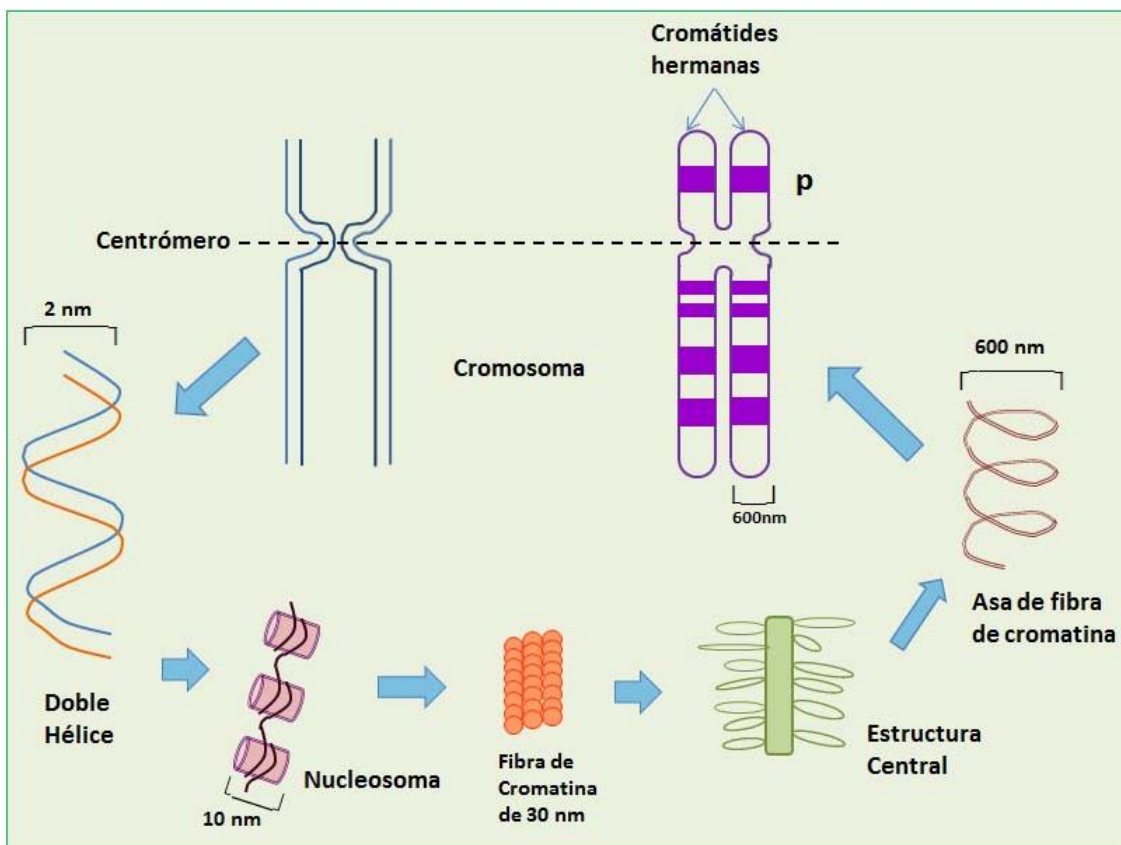


Figura 3.1. Niveles de empaquetamiento o compactación del ADN

Esta forma *loops* que se van a unir a una matriz proteica o “*scaffold*”. Esta estructura se espiraliza nuevamente dando lugar al empaquetamiento encontrado en el cromosoma metafásico. Durante la división celular los cromosomas están altamente empaquetados o condensados. En el cromosoma metafásico el ADN está 10000 veces más compactado respecto de la doble hélice lineal.

Es sabido que el contenido de ADN de una célula varía dependiendo del estadio o fase del ciclo celular en que se encuentre la misma. Se denomina C al contenido de ADN por célula y n al número de cromosomas en las gametas. La gran mayoría de las células humanas son diploides ($2n = 46$), es decir contienen dos copias del genoma humano; a excepción de las gametas que contienen la mitad, es decir, son haploides ($n = 23$).

El contenido de ADN varía según la etapa del ciclo celular en que se encuentra la célula (Fig. 3.2). Así, durante la fase G_1 , es decir antes de la síntesis del ADN, para una célula diploide hay una cantidad $2C$ de ADN y cada cromosoma está constituido por molécula simple de ADN. Después de completada la síntesis del ADN durante el periodo S , cada cromosoma va a estar constituido por dos hebras o cadenas de ADN y entonces $C=4$. Cada una de ellas se denominan cromátides y una es la réplica de la otra, se dice que ambas son cromátides hermanas. En G_2 , periodo posterior a S , C va a seguir siendo 4. Durante la mitosis M , los 46 cromosomas están constituidos por 2 cromátides hermanas, y una vez separadas éstas en la anafase/telofase, cada célula tendrá 92 cromosomas que posteriormente se dividirán entre las dos células hijas.

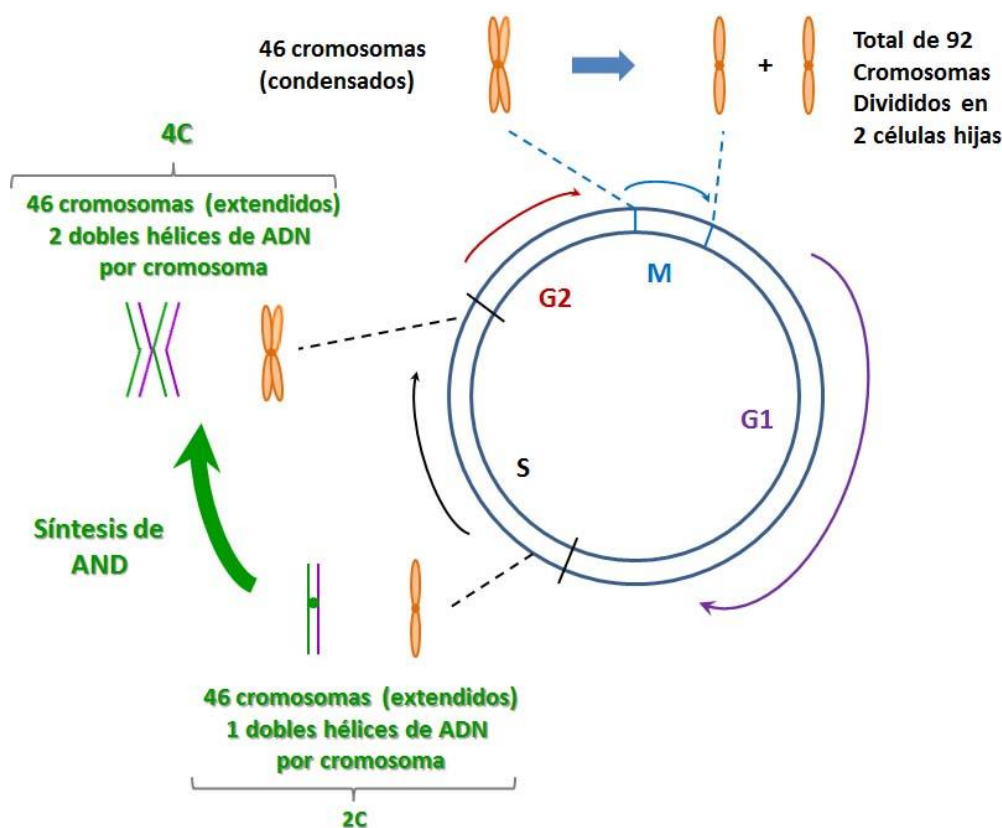


Figura 3.2. Los cromosomas durante la división celular

Una vez producida la síntesis de ADN cada cromosoma está constituido por 2 cromátides hermanas. Estas se encuentran unidas por una estructura proteica denominada centrómero o constricción primaria, la cual puede observarse bien definida en los cromosomas metafásicos. Así el centrómero divide a cada cromosoma en dos brazos: uno corto denominado p y otro largo llamado q. El centrómero posee un papel fundamental en la división celular como región a la que se unen las fibras del huso, y por tanto, controla la separación o segregación de ambas cromátides a las células hijas. Durante la profase tardía de la mitosis, un par de kinetocoros forman cada centrómero, cada uno unido a una cromátide hermana. Múltiples microtúbulos unidos a cada kinetocoro unen el centrómero a cada uno de los polos del huso acromático.

Los extremos de los cromosomas se denominan telómeros. Son estructuras especializadas, compuestas por ADN y proteínas, con una secuencia TTAGGG que se repite un número determinado de veces. Las principales funciones son:

- Mantener la integridad estructural del cromosoma
- Permitir que la replicación del ADN de los cromosomas sea completa
- Ayudar a establecer la estructura tridimensional del núcleo sugiriendo que cada cromosoma debe mantener una posición determinada dentro del mismo.

Cada especie posee un determinado set de cromosomas con un número, morfología y estructura que le son característicos. A estas características se las denominan constantes cromosómicas. El análisis de las mismas permite estudiar la constitución cromosómica de un individuo lo cual se conoce con el nombre de cariotipo.

En la gran mayoría de las células somáticas de la especie humana se distinguen 46 cromosomas (23 pares). Cada miembro de un par cromosómico deriva de un progenitor y se dice que ambos son cromosomas homólogos. Los 22 pares corresponden a autosomas o cromosomas somáticos y un par a cromosomas sexuales. El par sexual está constituido por dos cromosomas X en la mujer, y un cromosoma X y un cromosoma Y en el varón.

De acuerdo a la posición del centrómero los cromosomas humanos se clasifican en tres categorías:

- Metacéntricos: Cuando el centrómero se ubica en posición media
- Submetacéntricos: Cuando el centrómero está entre el centro y uno de los extremos
- Acrocéntricos: Tienen el centrómero cercano a un extremo. El brazo corto de ellos presenta unas estructuras denominadas satélites que se encuentran unidos al brazo corto propiamente dicho por los pedúnculos o tallos satelitales.

El cariotipo normal femenino se designa como 46,XX y el masculino como 46,XY (Fig 3.3).

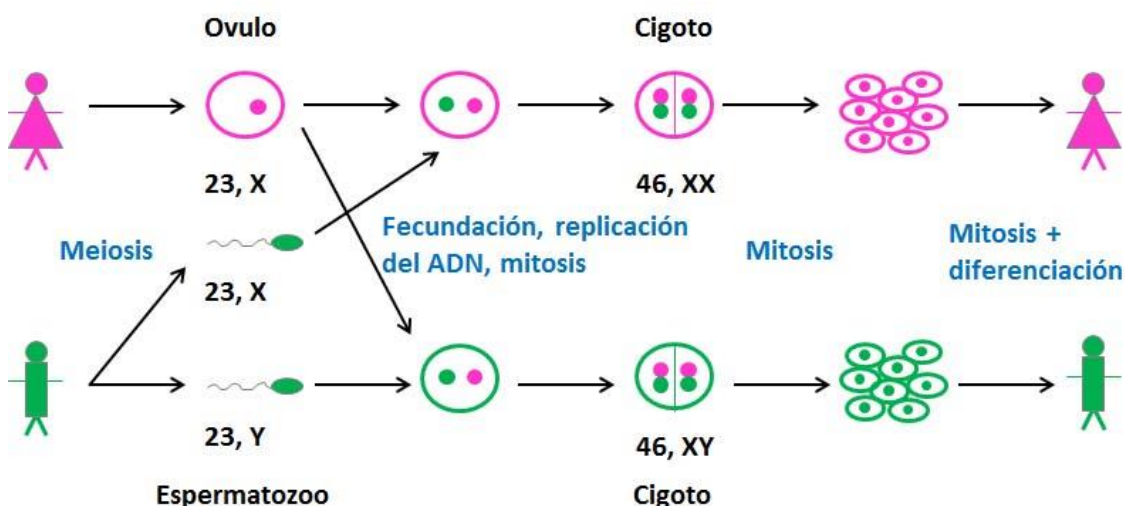


Figura 3.3.

Además del genoma nuclear, el ADN se encuentra en el genoma mitocondrial. Este último tiene características distintivas respecto del ADN, ya que es circular, hay un gran número de moléculas por mitocondria y no está asociado a proteínas como el ADN nuclear.

Los genes están esparcidos en todo el genoma, nuclear y mitocondrial. Se reconocen dos tipos generales de genes, en función de si su producto es una proteína o un ARN funcional. Se estima que de cada tipo de ellos hay entre 20000 a 25000 que codifican proteínas, pero el número puede ir variando con la evolución de las tecnologías y los avances de la informática y los métodos de estudio.

El cromosoma X posee un gran tamaño y contiene cerca del 5% del genoma nuclear. Se han localizado en él una gran cantidad de genes que codifican para proteínas importantes en ambos sexos. A diferencia, el cromosoma Y es de pequeño tamaño (70 mb) y contiene pocos genes, la mayoría de los cuales intervienen en el desarrollo y funcionamiento gonadal masculino. Hombres y mujeres no se diferencian en términos de los productos (como por ejemplo niveles de una

enzima) generados por la mayoría de estos genes del cromosoma X. Puesto que las mujeres tienen dos cromosomas X y el varón uno, debería existir algún mecanismo de “compensación de dosis” para que las células funcionen normalmente ya sea con uno o dos cromosomas X.

A principio de los años sesenta, la Dra. Mary Lyon emitió la hipótesis de que en las células somáticas de la mujer uno de los dos cromosomas X está inactivo, lo cual da por resultado una compensación de dosis que conlleva a la producción de cantidades aproximadamente iguales de los productos génicos ligados al X tanto en el varón como en la mujer (Fig. 3.4). Así, los hombres son constitucionalmente hemicígotos para los genes del X, mientras que las mujeres son funcionalmente hemicígotas, es decir, tienen una sola copia funcional de cada gen para este cromosoma.

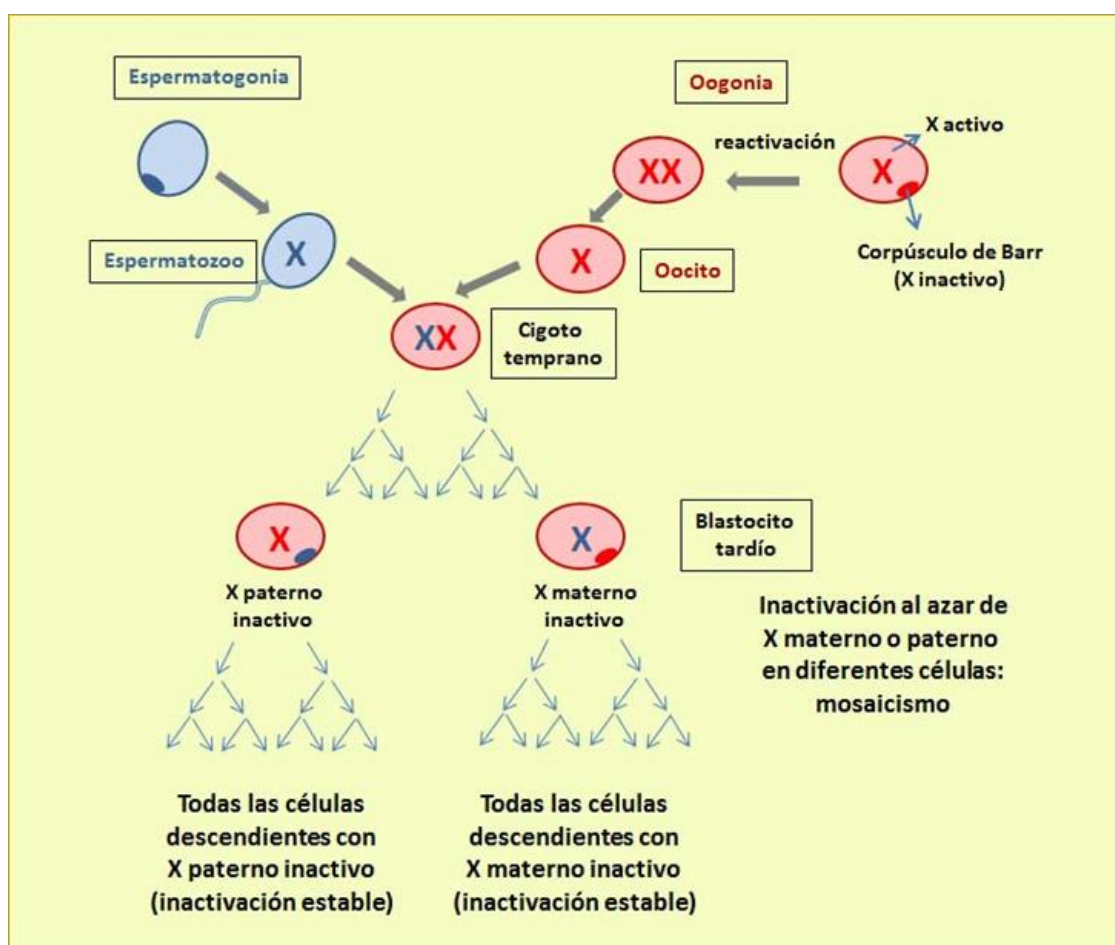


Figura 3.4. Inactivación del cromosoma X

La hipótesis de Lyon estableció que la inactivación del cromosoma X se produce en el desarrollo embrionario femenino temprano y que la inactivación es al azar: en algunas células se inactiva el X materno y en otras el X paterno. Una vez inactivado un cromosoma X en una célula (el paterno o el materno), éste permanecerá inactivo en toda su progenie. Como consecuencia de esto y en este sentido, todas las mujeres tienen dos poblaciones distintas de células: una posee un cromosoma X activo proveniente del padre y la otra un cromosoma X activo proveniente

de la madre. Esta hipótesis fue corroborada posteriormente por distintas evidencias citogenéticas, bioquímicas y moleculares.

Otras características del fenómeno de inactivación son:

- La inactivación tiene lugar tempranamente en el embrión. Se inicia en una única región del cromosoma X llamada centro de inactivación ubicado en la banda Xq13.2 y se propaga después por todo el cromosoma.
- El gen XIST ubicado en ese locus parece ser clave para el inicio de la inactivación.
- Aunque en las células que constituyen el embrión la inactivación es al azar, en las que dan origen a tejidos extraembrionarios se inactiva el X paterno solamente.
- El cromosoma X inactivo debe reactivarse en la línea germinal de las mujeres, de modo que cada óvulo recibirá un X activo.
- La inactivación del X no abarca a todos los genes de este, sino que es incompleta. Varias regiones permanecen activas en ambos X, en particular el extremo del brazo corto que es una región homóloga al brazo corto del Y llamada región pseudoautosómica.
- La inactivación del cromosoma X se asocia desde el punto de vista molecular a metilación. Se ha identificado el gen responsable que sólo se expresa en el X inactivo.

Los 23 pares cromosómicos presentan diferente tamaño y morfología. Así pueden distinguirse 7 grupos, como se indica en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1

<u>GRUPO</u>	<u>MORFOLOGIA</u>	<u>PARES CROMOSOMICOS</u>
A	Metacéntricos grandes	1,2,3
B	Submetacéntricos grandes	4,5
C	Submetacéntricos medianos	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, X
D	Acrocéntricos grandes	13, 14, 15
E	Submetacéntricos pequeños	16, 17, 18
F	Metacéntricos pequeños	19, 20
G	Acrocéntricos pequeños	21, 22, Y

El conocimiento del cariotipo es básico para la evaluación de enfermedades de causa cromosómica o cromosomopatías. Estas forman parte de la patología genética junto con las enfermedades monogénicas (aquellas en la cual hay alteración de un gen como albinismo,

acondroplasia, hemofilia, etc, y que se caracterizan por tener un patrón de herencia mendeliano), y las de origen multifactorial (donde intervienen varios genes y el factor ambiental puede tener un rol importante, por ej. diabetes, defectos del cierre del tubo neural, hipercolesterolemia, etc.).

Las enfermedades cromosómicas pueden ser originadas por anomalías en el número de cromosomas: síndromes de Down (trisomía 21), Edwards (trisomía 18), Turner (monosomía X), Klinefelter (trisomía XXY), etc; o ser de tipo estructural, pudiendo involucrar pérdidas, ganancias o reordenamiento de segmentos cromosómicos que veremos posteriormente.

El estudio de los cromosomas y sus anomalías en relación con la patología humana es el objeto de la Citogenética Clínica.

Las enfermedades cromosómicas comprenden el 10% de los defectos congénitos. Se observan en alrededor del 1% de los nacidos vivos, en el 5% de las muertes perinatales y en el 50-60% de los abortos espontáneos del primer trimestre.

Metodología para la obtención de cromosomas humanos

Fue desarrollada por Moorhead y colaboradores en 1960. En principio tenemos la posibilidad de poder utilizar distintos tejidos como sangre, médula ósea, piel, etc. Por supuesto que la elección del mismo va a depender de la indicación médica o del diagnóstico presuntivo.

En general el tejido de elección es sangre periférica ya que es de fácil obtención. Médula ósea se utiliza para el estudio cromosómico en enfermedades oncohematológicas. En otros casos el material de elección puede ser ganglio o tumores sólidos. Biopsia de piel o tejido ovárico cuando se detecta discordancia entre el cariotipo en sangre y el fenotipo del paciente. Con indicaciones muy precisas se pueden cariotipar espermatozoides o realizar estudios meióticos. Prenatalmente, se puede efectuar diagnóstico citogenético en material proveniente de vellosidades coriales o placentarias, o bien a partir de células del líquido amniótico.

Para realizar un estudio citogenético a partir de sangre periférica debemos tomar asépticamente una muestra de sangre con heparina sódica como anticoagulante (Fig. 3.5). Necesitamos obtener células en división ya que, como se dijo anteriormente, en el periodo de metafase es cuando mejor se observan los cromosomas al microscopio óptico. Puesto que en la sangre no hay células dividiéndose, sino que son elementos maduros, debo cultivar la sangre con una sustancia denominada Fitohemaglutinina que va a producir una regresión de los linfocitos T maduros a linfoblastos, estadio en el cual comienzan a proliferar y se dividen nuevamente.

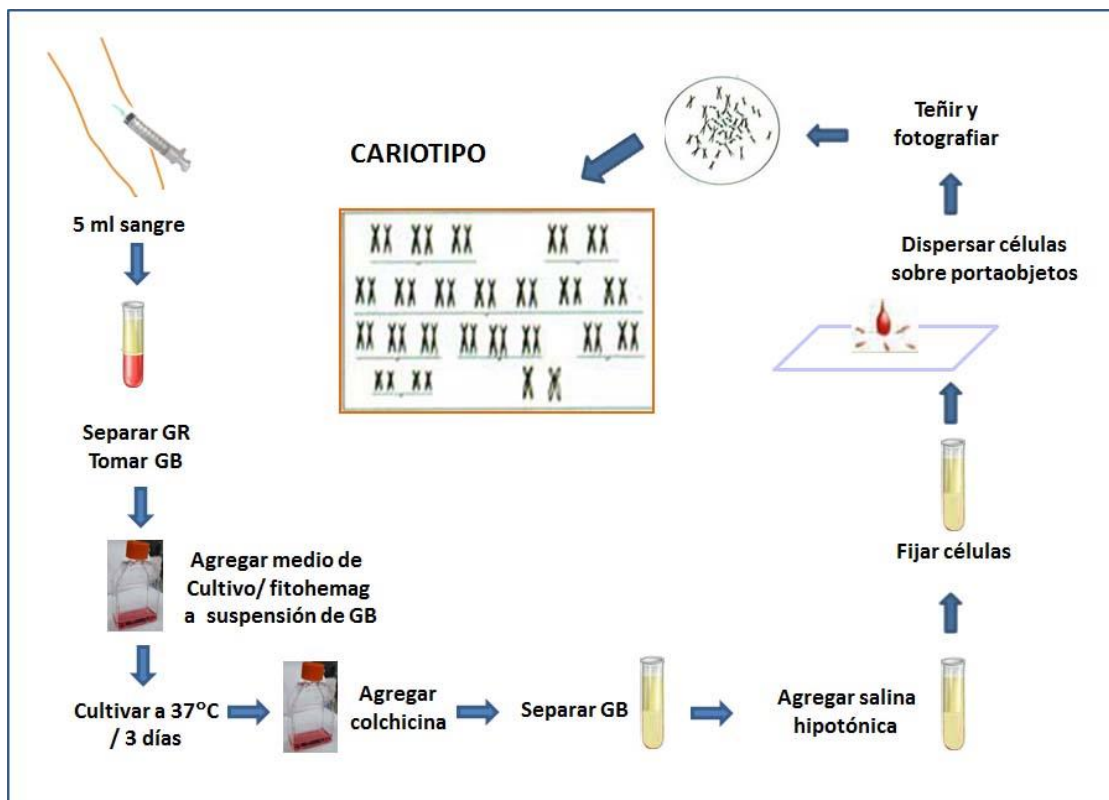


Figura 3.5. Procedimiento para la obtención y análisis de cromosomas humanos

El procedimiento consta de tres partes:

1- **Siembra:** En un tubo de material plástico de 15 ml con tapa a rosca, estéril, colocamos el medio de cultivo (que provee sales minerales, aminoácidos, un azúcar, vitaminas y otros nutrientes), suero fetal bovino (que provee de proteínas y factores de crecimiento), fitohemaglutinina, y la sangre. Debemos dejar los cultivos en estufa a 37°C durante 72 horas que es el tiempo en el cual hay mayor cantidad de células dividiéndose.

2- **Cosecha:** Pasado ese tiempo se deberá agregar Colchicina o Colcemid, que es un veneno mitótico. Detiene la división celular en la metafase. Esta sustancia impide la polimerización de la microtubulina y por tanto la correcta formación del huso acromático. Dejamos con colchicina un tiempo adecuado. Después de una primera centrifugación descartamos el sobrenadante y le agregamos al pellet solución hipotónica (KCl 0,075M) dejando actuar cierto tiempo. Esta solución va a producir una sensibilización de la membrana celular y una mejor dispersión de los cromosomas en el interior de la célula. Volvemos a centrifugar, descartamos el sobrenadante y agregamos al pellet fijador de Carnoy (3 partes de Metanol y 1 parte de Ácido Acético Glacial). El fijador va a actuar preservando las estructuras celulares, en nuestro caso queremos obtener una buena calidad de cromosomas. Después de una media hora realizamos un lavado con el mismo fijador y, posteriormente a otra centrifugación, se resuspende el pellet con una cantidad adecuada de fijador.

3- **Obtención de los preparados:** Tomamos unas gotas con una pipeta y las dejamos caer sobre un portaobjeto limpio. Secamos al aire y lo coloreamos con una solución al 5% de colorante según Giemsa, que es un colorante que tiene afinidad por el ADN.

Si observamos al microscopio con bajo aumento (100X) (Fig.3.6) veremos una gran cantidad de núcleos no estimulados y entre ellos unas figuras que corresponden a las metafases.



Figura 3.6. Observación al microscopio de los preparados coloreados con Giemsa (100X).

Si elegimos una metafase y la observamos al microscopio óptico con un aumento de 1000X e inmersión (Fig. 3.7), pueden observarse los cromosomas homogéneamente teñidos. Podemos contar los cromosomas y observar la morfología de estos. Se los puede clasificar según los grupos anteriormente vistos (A a G) pero no se puede identificar cada par cromosómico dentro un grupo. Por ejemplo, dentro de los del grupo C (submetacéntricos medianos) no puedo diferenciar un 8 de un 12 o de cualquier otro miembro de un par.



Figura 3.7. Metafase vista al microscopio con coloración convencional (Giemsa en buffer fosfato pH 6.8). 1000X e inmersión.

Para realizar el estudio citogenético debo analizar por lo menos 20 metafases. Según la indicación o diagnóstico presuntivo podrán analizarse un número mayor. Se deberá estudiar número y patrón de bandas G (que veremos a continuación) de cada una de ellas. De ser necesario se realizarán otras técnicas de bandeado.

Los preparados cromosómicos pueden ser sometidos a ciertas condiciones (agentes físicos, químicos o biológicos) para colorear en forma diferente distintas regiones o porciones de los mismos. Estas se denominan técnicas de bandeado cromosómico y podemos agruparlas en:

a)- **Técnicas diferenciales de bandeo:** Con ellas los cromosomas se presentan como un continuo de bandas claras y oscuras. Permiten identificar cada par cromosómico. Son ellas el bandeo G, el bandeo Q y el bandeo R. Son sumamente útiles para la detección de alteraciones cromosómicas estructurales.

Bandeo G: Es utilizado de rutina en nuestro medio. Se someten los preparados a la digestión controlada con tripsina en buffer fosfato pH 6.8 y posterior coloración con Giemsa. Las bandas oscuras se denominan G positivas. El mecanismo de formación no se conoce en forma precisa, pero se supone que este tratamiento resalta una estructura predeterminada en cada uno de ellos. Aunque estudios in vitro indican que el colorante se une al ADN, distintos tipos de proteínas cromosómicas podrían ser las que dan las bandas G positivas o negativas. Entre las características más sobresalientes podemos mencionar:

- Comprenden 5-10 megabases de ADN.
- Pueden contener cientos de genes.
- Las bandas G positivas son ricas en AT, de replicación tardía y pobres en genes.
- Las bandas G negativas son ricas en CG, de replicación temprana y contiene gran cantidad de genes.

La representación esquemática (idiograma) del patrón de bandas G de los cromosomas humanos fue publicada en 1971. Así, cada cromosoma posee un patrón de bandas que es único para ese par, y por lo tanto, puede ser identificado inequívocamente (Fig 3.8). Una alteración en el patrón de bandas de un cromosoma va acompañada de la presencia de una anomalía estructural.

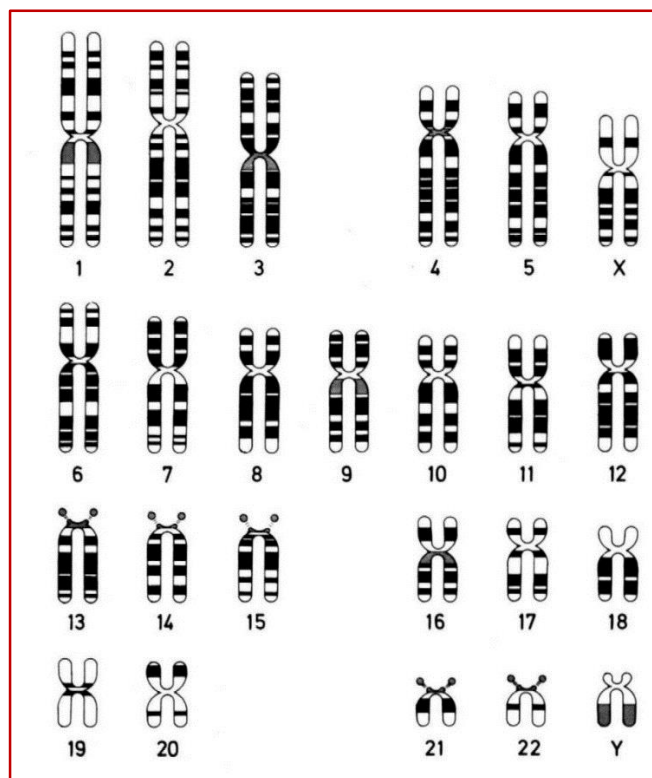


Figura 3.8. Idiograma del patrón de bandeo G de los cromosomas humanos. Conferencia de Paris, 1971. Tomada de ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013).

Bandeo Q: Se utiliza un colorante fluorescente como Quinacrina, DAPI o Hoechst 33258 que se une a zonas ricas en AT. Da un patrón similar al bandeado G. La composición del ADN a lo largo del cromosoma podría ser la base primaria para dar la coloración diferencial.

Bandeo R: Da un patrón esencialmente inverso al G. El tratamiento con calor en solución salina desnaturaliza zonas ricas en AT. La coloración con Giemsa produce un patrón dando bandas R positivas a las Q negativas. Este mismo patrón lo dan otros fluorocromos que se unen a zonas ricas en CG como la Cromomicina A3, Olivomicina o Mitramicina.

b)- **Técnicas de bandeado o tinción selectivas:** Permiten colorear específicamente determinadas zonas o regiones de los cromosomas. Entre ellos encontramos el bandeado C, NOR, Giemsa 11, etc.

Bandeo C: Esta técnica produce coloración selectiva de la heterocromatina constitutiva, que es un tipo especial de cromatina constituida por ADN altamente repetitivo (Fig. 3.9). Es inactiva desde el punto de vista transcripcional y permanece condensada a lo largo de todo el ciclo celular. Se ubica en los centrómeros de todos los cromosomas, en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9, 16 y en la porción distal del brazo largo del cromosoma Y.

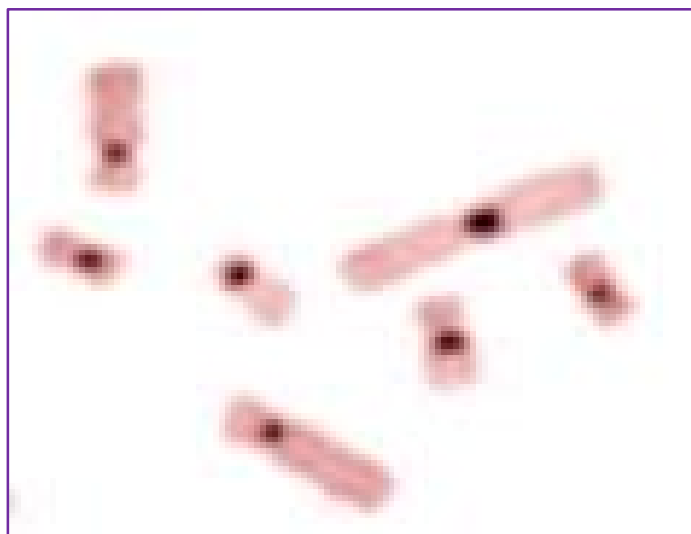


Figura 3.9. Patrón de bandeado C de los cromosomas humanos.

Estos bloques heterocromáticos pueden estar aumentados o disminuidos de tamaño sin afectar el fenotipo del paciente, ya que son zonas que no contienen genes que se transcriban. Por tanto, la variación de tamaño en ellos da lugar a los denominados **polimorfismos cromosómicos**, que son variantes normales en la población que se presentan con una frecuencia cercana al 1%. Ej. 46,XYqh+ indica que el bloque heterocromático (h) presente en la porción distal del brazo largo (q) del cromosoma Y está aumentado de tamaño (+).

Los preparados cromosómicos se someten a la acción de una solución de Hidróxido de Bario para desnaturalizar el ADN cromosómico. Posteriormente se incuban con solución salina citrada y luego se colorean con Giemsa al 10%.

Las zonas C negativas (no teñidas) corresponden a regiones donde el ADN se ha desnaturalizado. Luego al incubarse en solución salina el ADN se “rompe y se cae” en pedacitos. Proteínas no histónicas en las zonas C positivas protegen al ADN de la desnaturalización.

Es particularmente útil para estudiar cromosomas de morfología inusual que pueda ser originada a expensas de heterocromatina, también para precisar puntos de ruptura que involucren zonas heterocromáticas.

c)- **Técnicas con endonucleasas de restricción:** se tratan los preparados con distintas enzimas de restricción. El patrón de bandas obtenido depende del tamaño de los fragmentos producidos por el sitio de corte de la enzima, en algunos casos es parecido a un bandeo G mientras que con otras enzimas es más cercano a un bandeo C.

En resumen, podemos decir que bases moleculares de las técnicas de bandeo involucran:

- La composición de bases
- Las proteínas asociadas
- La organización funcional del genoma

Nomenclatura

A fin de utilizar un lenguaje universal en la denominación de los cromosomas, sus diferentes regiones y sus bandas, la escritura de los cariotipos patológicos, se creó un **Sistema Internacional de nomenclatura en Citogenética Humana (ISCN)** cuya última versión data de 2013, donde se establece toda la normativa respecto a este tema. Así el brazo corto se denomina p (por petit) y el brazo largo como q (por queue). Cada brazo cromosómico es dividido en regiones llamadas p1, p2, etc o q1, q2, contando desde el centrómero hacia los extremos o telómeros. Cada región está delimitada por ciertos marcadores o “landmarks”, los cuales pueden coincidir con alguna característica morfológica del cromosoma como un telómero, una banda importante, etc. Las regiones están divididas en bandas denominadas p11 (se lee p uno uno, no p once), p12, etc. Cada banda puede dividirse en subbanda por ej. p11.1 y también, si el nivel de resolución es alto, cada subbanda puede dividirse en sub-subbandas, como por ejemplo p11.11.

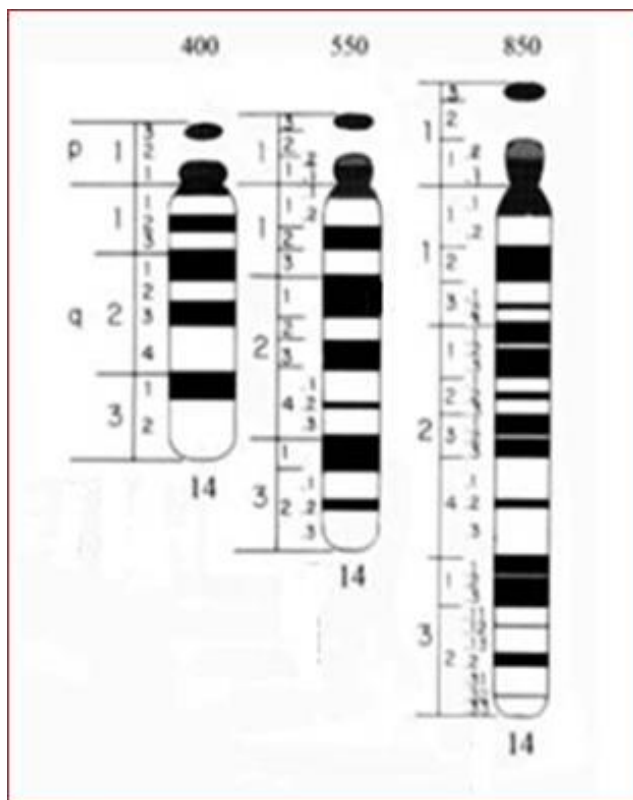


Figura 3.10. Idiograma del cromosoma 14 a distintos niveles de resolución.

Así, en la figura 3.10, la banda más distal (alejada del centrómero) del brazo largo del cromosoma 14 se denomina 14q32 para un nivel de resolución de 400 bandas por set haploide. Se trata de la banda 2 de la tercera región del brazo largo del cromosoma 14.

Existen otras técnicas especiales que también permiten estudiar los cromosomas. Entre ellas se encuentran:

a) Bando de Alta Resolución:

Mediante procedimientos técnicos adecuados es posible obtener cromosomas menos condensados que en la metafase, es decir, en un estadio de profase tardía o prometafase. Esta técnica da como resultado un incremento en el número de bandas. Así, si normalmente en los cromosomas metafásicos el número promedio de bandas es de unas 400 por set haploide, con este tipo de técnica es posible aumentarlas a 550, 850 o un número mayor. Ver figura anterior. La subbanda se indica por un punto (.), ej. 14q24.1. A los preparados obtenidos se le aplican generalmente técnicas diferenciales de bando, principalmente bando G.

Ello permite la detección de anomalías menos evidentes que no suelen detectarse a un nivel de resolución más bajo. El análisis de alta resolución es muy laborioso y requiere más tiempo, por lo que suele utilizarse sólo cuando el médico está buscando una anomalía cromosómica específica y sutil, o para determinar con mayor precisión el o los puntos de ruptura de un rearrreglo cromosómico.

b)- Hibridación in situ:

La hibridación o hibridación in situ permitió incorporar metodologías derivadas de la genética molecular a la citogenética clásica, resultando una combinación denominada Citogenética Molecular, representando un nuevo avance dentro de las tecnologías diagnósticas. Permite la localización de secuencias específicas de ADN en el material a analizar. Este último puede tratarse de cromosomas metafásicos o células interfásicas, a diferencia de la citogenética clásica que no permite analizar los cromosomas en interfase.

Se basa en hibridizar el material genético a estudiar con una sonda de ADN. Una sonda es una secuencia de interés que se encuentra marcada con una molécula exógena al ADN, y que posteriormente a la hibridización será detectada. En general, la sonda está marcada con un colorante fluorescente y la detección se hace directamente o mediante amplificación de la señal originada, metodología conocida como FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). En otros casos, la sonda es detectada por colorimetría clásica. Hay varios tipos de sondas:

- Centroméricas: constituidas por ADN satélite alfa, que es altamente repetitivo. Hay sondas que hibridan con todos los centrómeros, y otras que son específicas de un cromosoma determinado, por ej. sonda centromérica de cromosoma X.
- Pintado completo de un cromosoma o *Whole Chromosome Painting*: la sonda está constituida por muchos segmentos de ADN de distintas partes de un cromosoma y tiñen el cromosoma completo, por ej. Sonda de pintado completo de cromosoma 6.
- De secuencia única: constituida por ADN correspondiente a una secuencia generalmente involucrada en la producción de un síndrome, por ej. Sonda para la región crítica de síndrome de Williams (banda 7q23).

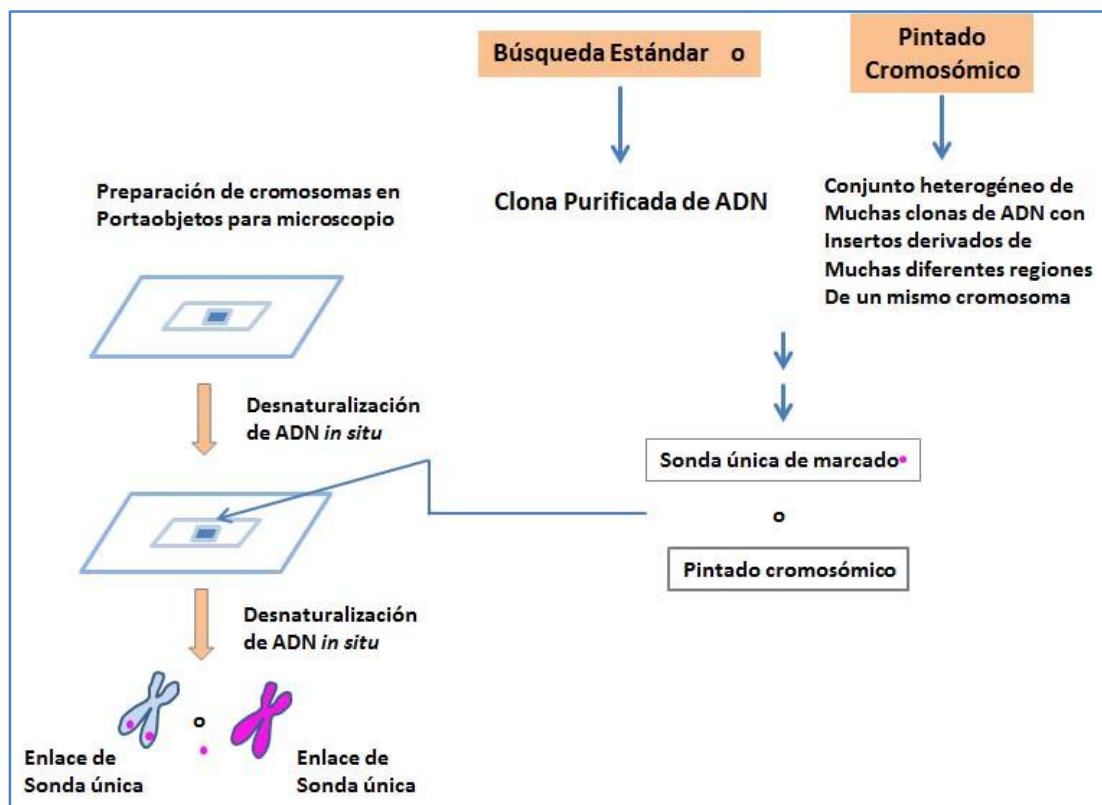


Figura 3.11. Metodología de la técnica de FISH

La técnica consta de varias etapas:

- 1- **Obtención de la sonda:** Se pueden comprar en forma comercial o fabricarlas en el laboratorio. Para ello hay distintos métodos a utilizar dependiendo de qué tipo de sonda se quiere preparar. El producto final será ADN con la secuencia de interés y secuencias repetitivas adyacentes. Una vez obtenida la sonda hay que marcarla para que pueda ser detectada.
- 2- **Hibridización in situ:** Tanto la sonda como el material a testear deberán ser desnaturados mediante calentamiento y por la acción de agentes químicos (formamida y otros). Luego se coloca la sonda sobre la muestra a testear y se lo incuba a 37°C en una cámara húmeda durante un cierto tiempo. Se hacen lavados para eliminar el exceso de sonda.
- 3- **Detección:** Si se usaron sondas directas se observa sin otro paso al microscopio de fluorescencia; en caso contrario, se debe recurrir al revelado. Este dependerá del tipo de marcador utilizado. Los más utilizados son la biotina y la digoxigenina.

Esta técnica permite estudiar células en interfase, tiene mayor resolución que las técnicas clásicas, se pueden utilizar distintos tipos de tejidos, permite el análisis de un gran número de células y se obtienen los resultados en pocos días. Es una técnica cara y requiere de un microscopio de fluorescencia con filtros especiales. No se pueden estudiar todos los cromosomas a la vez (por lo menos en el FISH clásico).

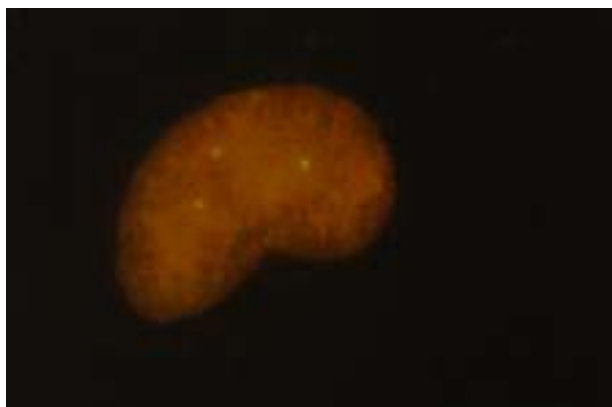


Figura 3.12. Se observa una célula de líquido amniótico en interfase que se ha hibridado con sonda de ADN centromérico para cromosoma 18.

En la Fig 3.12 se observan 3 señales fluorescentes amarillo verdosas. Cada una de ellas corresponde a la sonda que se ha hibridado al ADN centromérico de los cromosomas 18 presentes. Si se analizan varias células con el mismo patrón fluorescente podemos concluir que dicho hallazgo sería compatible con trisomía 18.

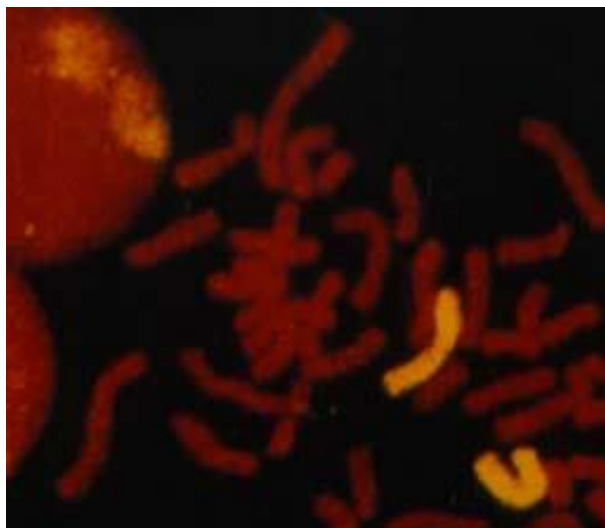


Figura 3.13. Metafase hibridizada con sonda de pintado completo de cromosoma 6 (WCP 6).

En la Fig. 3.13 se observan pintados de color amarillo verdosos los dos cromosomas 6 y los dos dominios de cromosoma 6 en los núcleos interfásicos adyacentes a la metafase. Se la utiliza para determinar si hay parte de cromosoma 6 unido a otro cromosoma, siendo útil para el análisis de translocaciones y otros rearrreglos de este cromosoma.

Existen en la actualidad otras técnicas de estudio de los cromosomas que involucran metodologías moleculares, algunas de ellas son variantes del FISH. Entre ellas se pueden mencionar:

- Hibridización de fibras de cromatina extendidas (fib ish)
- Hibridización genómica comparativa (CGH)
- Análisis cromosómico usando sondas obtenidas por microdissección cromosómica
- Painting multicolor
- Microarrays
- Ensayos específicos de región (rsa), que permiten cuantificar el número de copias de un locus determinado.

Indicaciones del estudio citogenético

Son varias las indicaciones o motivos por el cual un médico puede solicitar un estudio citogenético. Muchas se deducirán a lo largo del estudio de las anomalías cromosómicas. Entre ellas podemos mencionar:

- Dismorfias y malformaciones congénitas con o sin diagnóstico presuntivo
- Retardo mental de origen desconocido
- Genitales ambiguos
- Trastornos del crecimiento
- Alteraciones del desarrollo sexual
- Amenorrea primaria o secundaria

- Alteraciones del espermograma (azoospermia u oligospermias severas)
- Problemas reproductivos (infertilidad, esterilidad)
- Antecedentes familiares de anomalía cromosómica
- Trastornos oncohematológicos
- Diagnóstico prenatal citogenético

ANOMALIAS CROMOSÓMICAS – Mitosis y Meiosis

En algunas ocasiones se encuentran alteraciones en el número o en la estructura de los cromosomas, o en ambos. En el primer caso hablamos **de alteraciones cromosómicas numéricas** y en el segundo caso de **alteraciones cromosómicas estructurales**. En ambos casos se genera una alteración en el equilibrio normal del genoma que puede originar alteraciones en el fenotipo como malformaciones congénitas, retardo mental, anomalías del desarrollo sexual, infertilidad, esterilidad, etc.

Las anomalías cromosómicas o **cromosomopatías** son responsables de una proporción significativa de las enfermedades genéticas, presentándose en el 50 a 60% de los abortos espontáneos del primer trimestre, en el 5% de los nacidos muertos y en el 0,7 % de los nacidos vivos. Por lo tanto, son una causa importante de morbilidad y mortalidad.

Antes de comenzar con el estudio de las mismas repasaremos brevemente los conceptos de mitosis y meiosis prestando particular atención al comportamiento de los cromosomas durante la división.

Mitosis

La mitosis es el mecanismo de división de las células somáticas (Fig. 3.14). Previo a iniciarse la mitosis la célula replica su ADN. Cada cromosoma estará entonces constituido por dos cromátides hermanas. En la metafase los cromosomas se sitúan en la placa ecuatorial de la célula, y en el anafase cada cromosoma separa sus dos cromátides a partir del centrómero (que se encuentra duplicado), para migrar cada una a una de las células hijas. Luego de la citocinesis, obtendremos dos células hijas con la misma información genética que la que le dio origen.

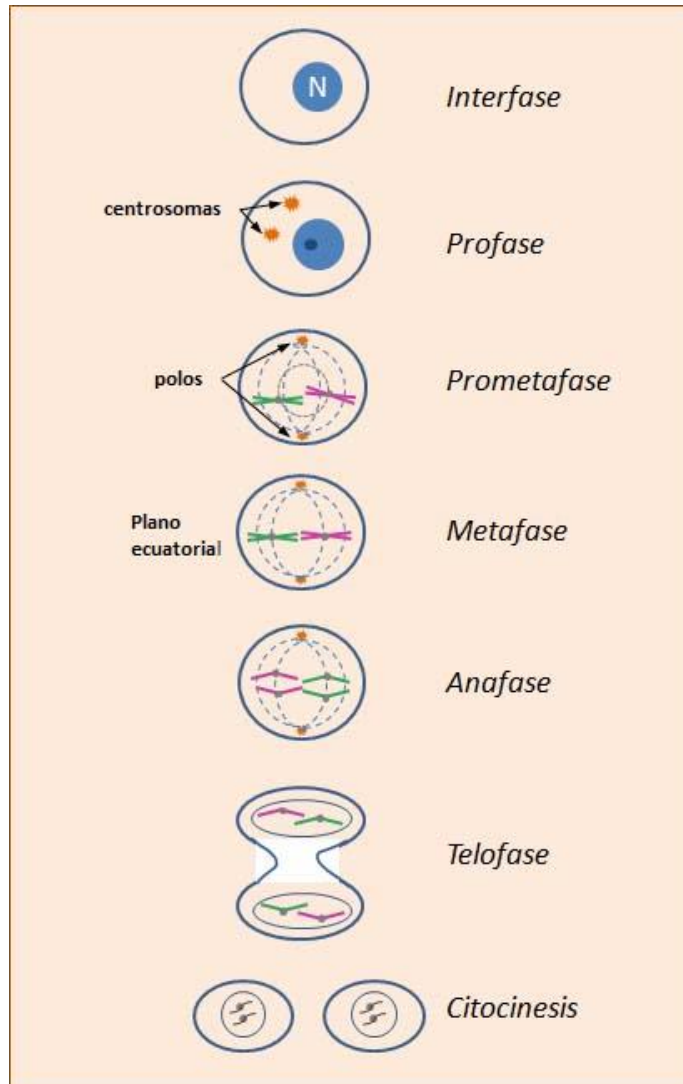


Figura 3.14. Esquema de Mitosis

Meiosis

La meiosis es el mecanismo de división de las células que darán origen a las gametas (Fig. 3.15). Es un proceso especializado en el cual a partir de una célula diploide se obtienen gametos haploides. Ello se logra combinando dos divisiones completas con una sola replicación del ADN.

Previamente a entrar en meiosis la célula debe duplicar su ADN. En la compleja profase de la meiosis I se aparean los cromosomas homólogos en un proceso denominado sinapsis. Cada par apareado se denomina bivalente. Durante este proceso se produce el intercambio de material genético llamado recombinación o crossover, que es evidenciado citológicamente por la formación de unas estructuras denominadas quiasmas. Una vez en metafase I los bivalentes se ubican en el plano ecuatorial de la célula y en el anafase siguiente se separa cada par de homólogos, cada uno irá a una de las células hijas. De esta forma, después de la citocinesis, en cada célula hija tendremos la mitad de los cromosomas; es decir, la meiosis I es reduccional puesto que el número de cromosomas se reduce a la mitad.

La meiosis II es similar a una mitosis en la que hay 23 cromosomas en lugar de 46. Cada cromosoma consiste en dos cromátides y estas se separarán en la anafase II. Sin embargo, las dos cromátides de un cromosoma en la meiosis II pueden ser genéticamente diferentes como resultado del crossover en la profase I.

Aunque conceptualmente el mecanismo biológico para generar gametas es el mismo (meiosis), el procedimiento que se lleva a cabo en la mujer u ovogénesis difiere en varios aspectos de la gametogénesis masculina o espermatogénesis.

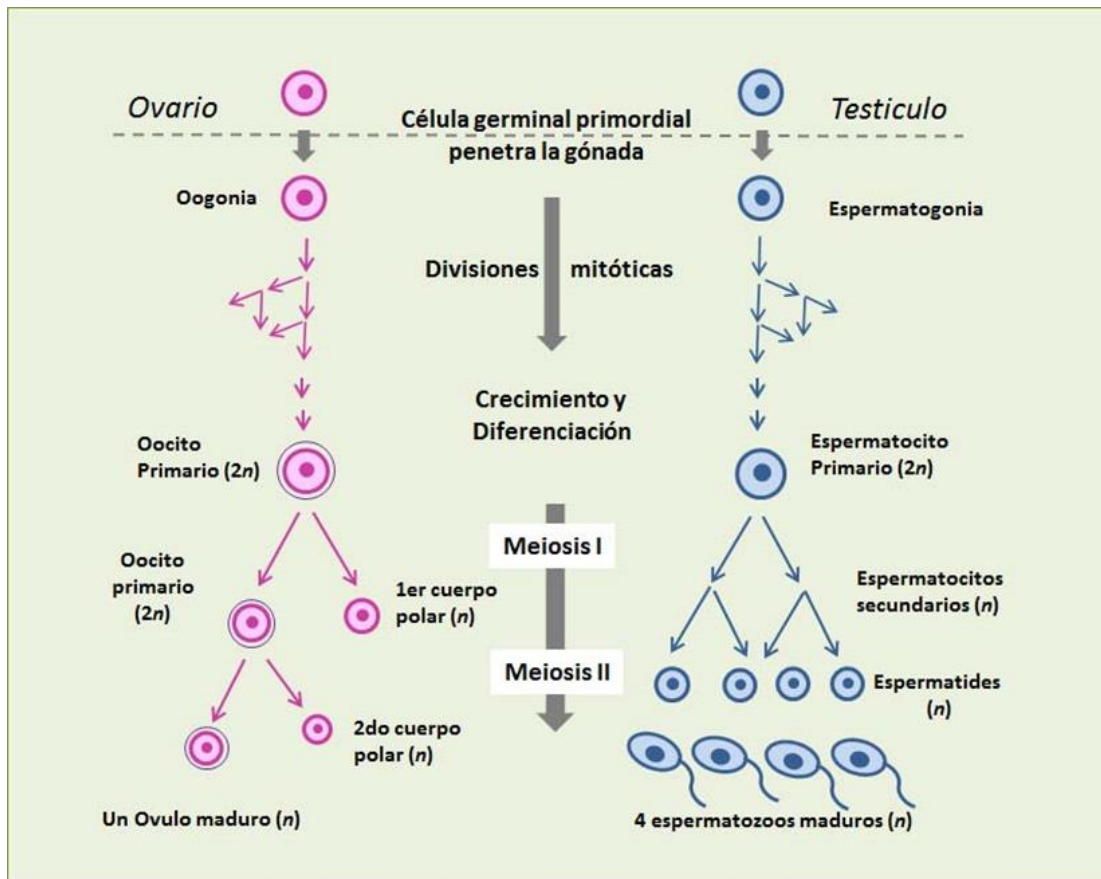


Figura 3.15. Diagramas de ovogénesis y espermatogénesis

En la ovogénesis las células germinales primordiales migran e invaden los ovarios en desarrollo durante los primeros meses de vida embrionaria. Estas oogonias proliferan por mitosis durante varios meses produciendo una gran cantidad de células que alrededor del quinto mes dejan de proliferar y, ya convertidos en ovocitos primarios, comienzan su primera profase meiótica. En estos, la meiosis queda detenida en el diplotene de la profase I. Sin embargo, la gran mayoría de las oogonias no llegan a madurar y degeneran en el ovario. Además, muchos ovocitos que se desarrollan también degeneran. Este proceso se continúa hasta el final de la vida reproductiva de la mujer.

Desde la pubertad, un folículo en desarrollo por mes es estimulado hasta madurar, momento en el cual se produce la liberación del folículo por el ovario (ovulación). En este momento se completa la primera división meiótica dando lugar al ovocito secundario y al primer cuerpo polar

(de menor tamaño). El ovocito secundario entra en meiosis II y queda en la metafase II hasta que es fecundado por un espermatozoide, se completa la meiosis II y se libera el segundo corpúsculo polar. Como resultado de la ovogénesis, a partir de una oogonia se origina un ovocito maduro (con una constitución genética diferente de la célula que le dio origen) y dos cuerpos polares que en general no son fecundados.

Durante la espermatogénesis las espermatogonias se desarrollan a partir de las células germinales primordiales que migran hacia los testículos en las primeras fases de la embriogénesis. Cuando se alcanza la madurez sexual, las espermatogonias se dividen por mitosis renovándose continuamente y algunas entran en meiosis convirtiéndose en espermatoцитos primarios, que posteriormente completan la división meiótica I convirtiéndose en espermatoцитos secundarios. Después de completar la meiosis II se producen las espermátides haploides que luego sufren un proceso de diferenciación para transformarse en espermatozoides.

Como resultado de la espermatogénesis, a partir de una espermatogonia diploide se obtienen 4 espermatozoides haploides con información genética diferente de la célula que les dio origen.

Anomalías cromosómicas numéricas

Las células que contienen un múltiplo de 23 cromosomas en su núcleo se denominan euploides. Así, las gametas haploides (23 cromosomas, $n=1$) y las células somáticas diploides (46 cromosomas, $n=2$) son euploides.

La poliploidía o presencia de una serie completa o más de cromosomas adicionales también puede ocurrir en el ser humano, como la triploidía (69 cromosomas, $n=3$) o la tetraploidía (92 cromosomas, $n=4$).

Las células que no contienen un múltiplo de 23 cromosomas se denominan aneuploides. En éstas se pierde algún cromosoma o presentan alguno adicional. Por lo general, solo se afecta a un par cromosómico pero es posible que se pierda o esté duplicado más de un cromosoma, por ej. 48,XXY,+18.

Las aneuploidías o aneusomías de los autosomas se encuentran entre las anomalías cromosómicas de mayor relevancia clínica.

Las aneuploidías se pueden originar por:

- a) Falla en la separación o disyunción de los cromosomas homólogos o cromátides hermanas en la anafase de la meiosis o mitosis, lo cual conlleva a que dichos elementos migren hacia un mismo polo. Este mecanismo se conoce con el nombre de no disyunción.
- b) Falla en la inclusión de un cromosoma en una de las células hijas. Se conoce con el nombre de anafase lag o retardada. Si bien hay una separación, esta puede ocurrir tardíamente y el elemento no ser incorporado a una de las células hijas al final de las meiosis I, II o mitosis.

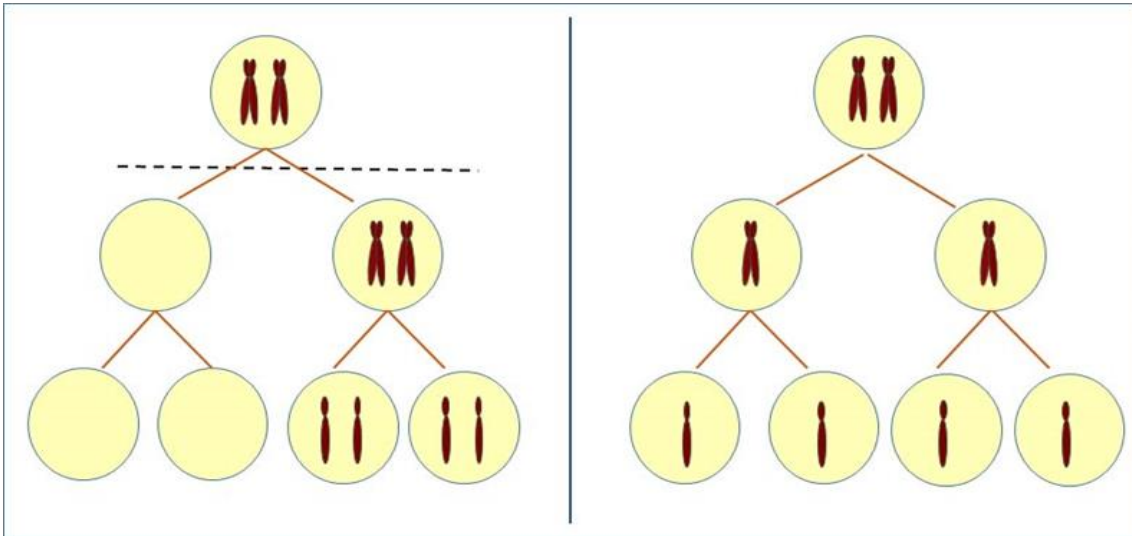


Figura 3.16. Meiosis I

En el esquema de la derecha en la Fig 3.16 vemos el comportamiento normal de un par de cromosomas homólogos durante la meiosis. En el diagrama de la izquierda ha ocurrido una falla en la separación o no disyunción en meiosis I y los dos miembros del par cromosómico migran a la misma célula hija donde luego terminan separándose, quedando ésta con una copia extra del cromosoma involucrado, al igual que las gametas resultantes. La otra célula no recibe ningún miembro de ese par de homólogos.

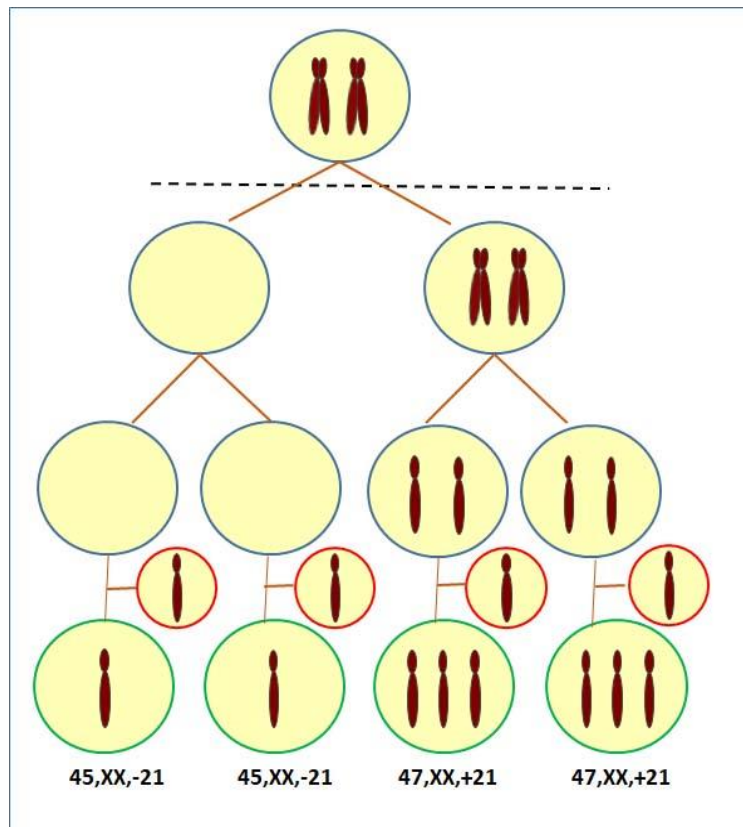


Figura 3.17. Ejemplo de no disyunción en meiosis I masculina

En la Fig. 3.17 se representa una no disyunción en meiosis I para el cromosoma 21 durante la espermatogénesis. Se observan como resultado gametas con un cromosoma 21 extra (disómicas) que al fecundar un ovocito normal darán origen a un cigoto 47,XX,+21 o 47,XY,+21 (con trisomía 21) según cual sea el complemento sexual; y gametas sin cromosoma 21 (nulisómicas) que al fecundar un ovocito normal darán origen a cigotos 45,XY,-21 o 45,XX,-21 (con monosomía 21).

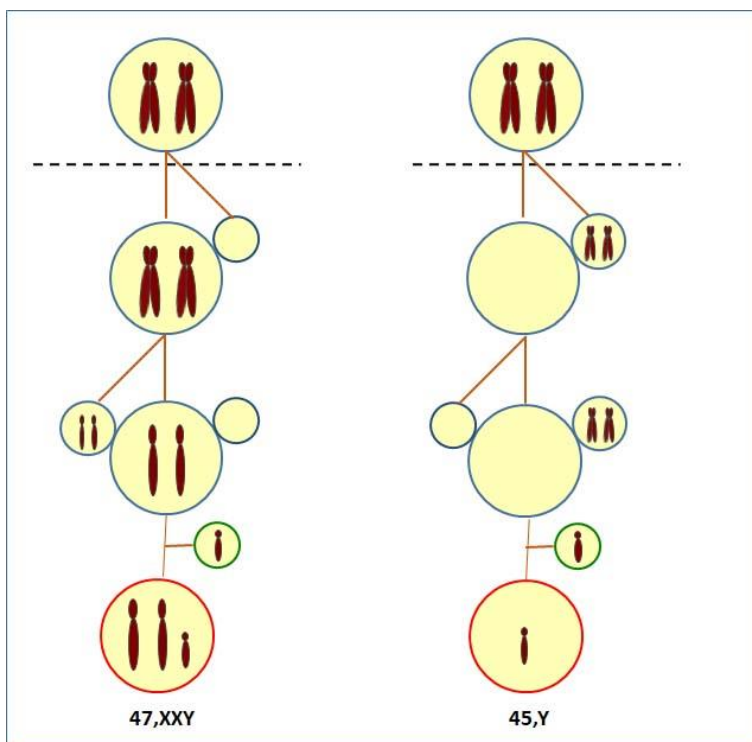


Figura 3.18. Ejemplo de no disyunción en meiosis I femenina.

En la Fig 3.18 se ha representado en el esquema al cromosoma X. A la izquierda, como resultado de la no disyunción en meiosis I los dos cromosomas X migran a la misma célula, en este caso la que va a dar origen al ovocito. Así, éste tendrá dos cromosomas X y al ser fecundado por un espermatozoide normal con complemento sexual Y dará origen a un cigoto 47,XXY que es compatible con un Síndrome de Klinefelter. Si ese espermatozoide portara un cromosoma X en lugar de un Y, se generaría un individuo con cariotipo 47,XXX. A la derecha de la figura, como resultado de la no disyunción, los dos X quedan en el primer cuerpo polar. Por tanto, el ovocito carece de cromosoma sexual y al ser fecundado por un espermatozoide portando el cromosoma Y dará origen a un cigoto 45,Y que no es viable. Si el espermatozoide portara un cromosoma X en lugar de un Y, se generaría un individuo con cariotipo 45,X compatible con el síndrome de Turner.

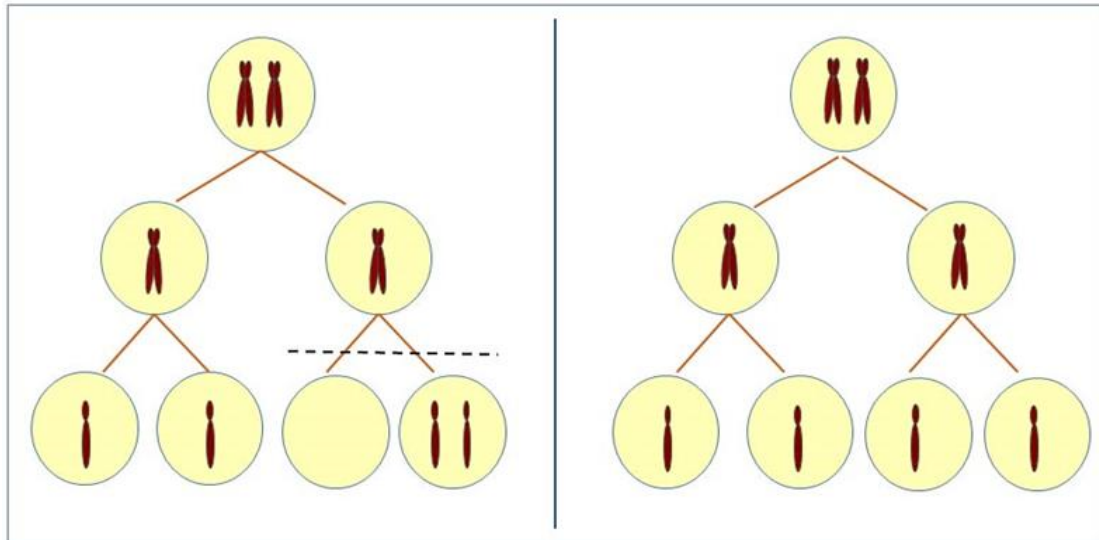


Figura 3.19. No disyunción en meiosis II

A la derecha de la Fig.3.19 se representa una meiosis normal y a la izquierda una en la que ha ocurrido una *no* disyunción en meiosis II. Hay falla en la separación de las cromátides y ambas migran a la misma célula hija donde posteriormente lograrán separarse. Si se tratara por ejemplo de una espermatogénesis y del cromosoma X, como resultado de esta división anormal tendríamos espermatozoides sin cromosoma sexual (nulisómicos), normales (con un X, es decir monosómicos) y con dos cromosomas X (disómicos).

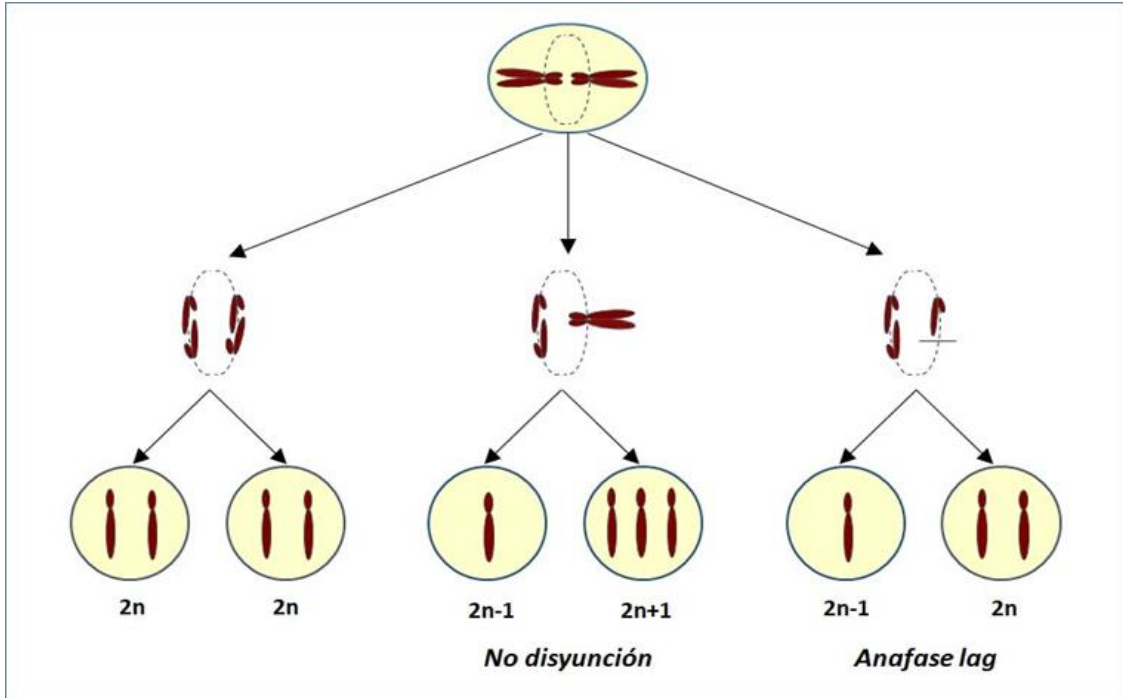


Figura 3.20. No disyunción y anafase lag mitóticas

A la izquierda de la Fig 3.20 se muestra una mitosis normal, en el centro una no disyunción mitótica y a la derecha un anafase lag. En esta última, el cromosoma que no es incluido en las células hijas queda dentro de un resto de citoplasma (micronúcleo) y posteriormente es degradado.

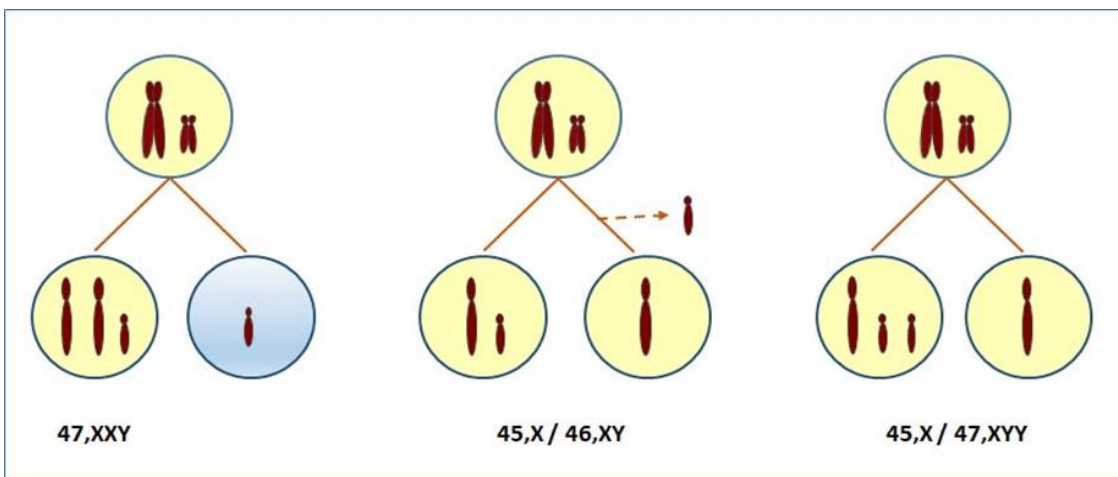


Figura 3.21. No disyunción y anafase lag mitóticas

Si la no disyunción meiótica o anafase *lag* se producen a nivel del cigoto o en estadios embrionarios muy tempranos, existe la posibilidad que como resultado de ésta el individuo sea mosaico, es decir, se encuentren presentes en él dos líneas celulares.

Así, en la Fig. 3.21 en el esquema de la izquierda, una no disyunción mitótica en el cigoto dará lugar a células 47,XXY y 45,Y. Puesto que ésta última no es viable, las mitosis sucesivas darán lugar a un individuo 47,XXY. Sin embargo, en el caso del esquema del medio, una anafase lag del cromosoma Y en el cigoto dará lugar a dos tipos celulares: uno 45,X y otro 46,XY. Por mitosis sucesivas de ambas se originará un individuo mosaico cuyo cariotipo se escribe 45,X/46,XY. Por otro lado, en el esquema de la derecha, una no disyunción del cromosoma Y originará una célula 45,X y otra 47,XYY que por divisiones sucesivas de ambas darán lugar a un individuo mosaico 45,X/47,XYY.

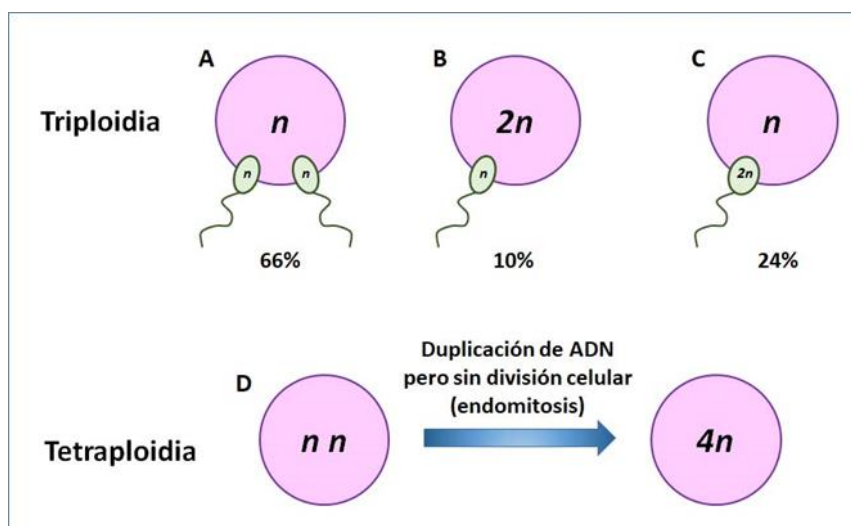


Figura 3.22. Triploidías y tetraploidías

En las **triploidías** el número de cromosomas es de 69. El mecanismo de origen puede ser uno de los siguientes:

- 1- Dispermia: Es la fecundación de un ovocito por dos espermatozoides. Es el mecanismo más común (70% de los casos)

2- Fertilización de un óvulo diploide por un espermatozoide haploide.

3- Fertilización de un óvulo haploide por un espermatozoide diploide.

El 85% de las triploidías se presenta como una mola hidatiforme parcial (ver más adelante) y el set cromosómico extra es de origen paterno. El 15% restante tiene fenotipo no molar y el set cromosómico extra es de origen materno.

En las **tetraploidías** el número de cromosomas es de 92. Se pueden producir por:

1- Falla en la primera división del cigoto, es decir todos los cromosomas duplicados migran hacia la misma célula hija. Es el mecanismo más frecuente.

2- Fusión de dos cigotos diploides

3- Trispermia: Fecundación de un óvulo por tres espermatozoides. Estas resultan en una mola hidatiforme parcial (ver mas adelante)

La **Trisomía 21 o Síndrome de Down** se observa en 1/800 nacidos vivos, siendo la anomalía cromosómica más frecuente compatible con la gestación a término. Fue descrito en 1866 por John Langdon Down. Recién en 1959 se descubrió que este síndrome está causado por la trisomía del par 21.

El conjunto de signos que presentan estos pacientes hace posible su diagnóstico clínico. Los signos faciales incluyen puente nasal bajo, fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, orejas pequeñas, piel redundante en el párpado inferior (pliegue epicanto), protrusión lingual. El cuello es corto y las manos y los pies tienden a ser anchos y cortos. El 50% presenta pliegue palmar único. La hipotonía generalmente se encuentra presente al nacimiento. En la mayoría de los individuos con este síndrome el retraso mental suele ser moderado a grave.

Cerca del 3% de los lactantes pueden presentar obstrucción del duodeno, atresia del esófago, duodeno o ano. Las infecciones respiratorias son frecuentes y el riesgo de desarrollar leucemia es de 15 a 20 veces superior al de la población general. Cerca del 40% nacen afectados de problemas cardíacos estructurales como la falta de cierre durante el desarrollo fetal de los tabiques interauricular e interventricular o defectos del tabique ventricular.

El 95% de los síndromes de Down ocurren por trisomía libre, es decir hay un cromosoma 21 extra o adicional. En el 3% de los casos se detecta una translocación robertsoniana asociada (ver anomalías cromosómicas estructurales) y el resto son mosaicos con la línea normal.

Mediante estudios de RFLP y otros polimorfismos entre los afectados y sus progenitores se vio que en el 95% de los casos el cromosoma extra es de origen materno, existiendo una fuerte correlación con la edad de la misma. En cerca del 75 % de los casos la no disyunción ocurre en meiosis I y el resto en meiosis II.

Se han realizado intensos esfuerzos para definir la porción fundamental del cromosoma 21 responsable de este trastorno. Esta región se ha estrechado hasta 21q22.22. Personas con únicamente trisomía de esta región presentan el síndrome.

La **Trisomía 18** también conocida como **Síndrome de Edwards** tiene una prevalencia de 1/6000 nacidos vivos. Generalmente presentan retraso del crecimiento prenatal, signos faciales

característicos y una anomalía distintiva de la mano (cabalgamiento de los dedos) que frecuentemente permite que los médicos realicen el diagnóstico clínico. Entre las anomalías menores encontramos orejas de fauno, boca pequeña, dedos gordos bastante cortos. La mayoría de los recién nacidos presentan defectos cardíacos severos, onfalocele (protrusión del intestino en el cordón umbilical), hernia diafragmática. Cerca del 50% fallecen en el primer mes de vida extrauterina. El grado de retraso es mucho más significativo que en el síndrome de Down. Un pequeño porcentaje tiene mosaicismo y es edad materna dependiente. En caso de Trisomía 18, el cariotipo correspondiente es 47,XX,+18.

La **Trisomía 13 o Síndrome de Patau** se presenta en 1/10000 nacimientos. El patrón de malformación es característico y permite su diagnóstico clínico: fisuras orofaciales (labio leporino y/o paladar hendido), microftalmia, polidactilia postaxial. Las malformaciones del sistema nervioso central son frecuentes. El retraso mental es muy significativo y el 90% de los casos fallecen antes del primer año de vida. Al igual que las trisomías 21 y 18 es edad materna dependiente. Se calcula que el 95% o más de las concepciones con trisomía 13 o 18 se pierden como aborto espontáneo durante el embarazo.

El **Síndrome de Klinefelter** tiene una incidencia es de 1/1000 varones nacidos vivos. El cariotipo predominante es 47,XXY. El 15% de los casos se presentan como mosaicos. En el 60% de los casos el cromosoma X extra es de origen materno siendo un síndrome edad materna dependiente.

Los pacientes son altos y delgados, con las extremidades desproporcionadamente largas. Su apariencia física es normal hasta la pubertad cuando se observa hipogonadismo. Los testículos son pequeños y firmes. La mayoría de los individuos afectados de este síndrome son estériles como consecuencia de atrofia de los túbulos seminíferos. En un tercio de los pacientes se observa ginecomastia que provoca un aumento de riesgo de cáncer de mama. Existen ciertas discapacidades del aprendizaje y aunque no tienen retardo mental, suelen tener coeficientes de intelecto menores que sus hermanos.

Algunos casos pueden ser 48,XXXXY o 49,XXXXXY. El grado de retraso mental y deficiencias físicas aumenta con el número de cromosomas X extras. Debido a la sutileza de este trastorno, en general pasan desapercibidos hasta la edad reproductiva en la que son diagnosticados en clínicas de fertilidad.

El **Síndrome de Turner** tiene una incidencia de aproximadamente 1/5000 niñas nacidas vivas. En cerca del 50% de los casos el cariotipo 45,X con ausencia de un cromosoma sexual. El 20-35 % son mosaicos 45,X/46,XX o 45,X con otra línea con anomalía estructural del X como delección o isocromosoma del brazo largo i(Xq). El resto presentan una anomalía estructural del X, siendo la más frecuente el i(Xq). Ver anomalías cromosómicas estructurales.

El 99% de las concepciones 45,X termina en aborto espontáneo. En el 80% de los casos el cromosoma perdido es de origen paterno. Las anomalías fenotípicas características del síndrome de Turner son: estatura baja, disgenesia gonadal, facies inusual característica, pterygium colli,

tórax ancho con mamilas muy separadas, elevada incidencia de malformaciones renales y cardiovasculares. En general no sufren retardo mental.

Si bien la terapia estrogénica puede desarrollar los genitales, los caracteres sexuales secundarios y la menstruación, en general no corrige la esterilidad ocasionada por la atresia temprana de las células germinales. Un número muy pequeño de ellas han tenido hijos. La baja estatura suele mejorarse por el tratamiento con STH.

El cariotipo **47,XXX** está presente en 1/1000 mujeres. Presentan fenotipo prácticamente normal, pueden tener retraso del lenguaje o dificultados del aprendizaje. Aunque se ha descrito reducción de la fertilidad en algunos casos, en general tienen descendencia y esta es cromosómicamente normal.

El **Síndrome de Sandberg** con cariotipo 47,XXY tiene una incidencia de 1/1000 varones. Son altos, con aspecto físico normal. No presentan retardo mental pero en algunos casos puede haber retraso del lenguaje. También se describieron pacientes con trastornos conductuales. Fertilidad normal.

En algunos pocos casos, en un embarazo anormal la placenta se convierte en una masa de tejido que recuerda a un racimo de uvas o a un quiste hidatídico. Esto se debe a un crecimiento anormal de las vellosidades coriales en las que el epitelio prolifera y ocurre cavitación quística del estroma. A un embarazo con estas características se lo denomina **molar**. Una mola puede ser **completa** si hay ausencia de embrión, o puede ser **parcial** cuando hay presencia de éste. Los orígenes de los dos tipos de molas son diferentes.

Las molas parciales son triploides (con dos conjuntos cromosómicos extras paternos) o tetraploides (con 3 conjuntos cromosómicos extras paternos). En las molas parciales el feto raramente sobrevive a término. Los embarazos triploides sólo sobreviven si el conjunto cromosómico extra es de origen materno (triploide no molar). La especificidad del efecto constituye un ejemplo de lo que conocemos como “*imprinting* genético”.

Anomalías cromosómicas estructurales

Una **anomalía cromosómica estructural** implica la modificación de la estructura de uno o más cromosomas. Estos **reordenamientos** o **aberraciones** pueden ocurrir de varias maneras, debiéndose producir una o varias **rupturas** en uno o más cromosomas dependiendo del tipo de anomalía estructural que se trate.

Rupturas en los cromosomas pueden producirse como resultado de daño al ADN (por radiaciones, drogas, virus, etc.) o como parte del mecanismo de recombinación. En el primero de los casos, aunque en las células existen mecanismos de reparación que tratan de subsanar el daño, en algunas ocasiones, éste puede ser tan grave o los mecanismos de reparación no ser lo sufi-

cientemente eficientes, pudiéndose originar alteraciones que modifican la estructura de los cromosomas. En el segundo de ellos, alteraciones de la estructura de los cromosomas pueden producirse cuando cromosomas homólogos se alinean en forma incorrecta durante la profase I meiótica y como resultado de ello ocurre cross-over desigual, pudiendo dar origen a duplicaciones y deleciones de los segmentos cromosómicos involucrados.

Las anomalías cromosómicas estructurales pueden ser **equilibradas, balanceadas o simétricas** cuando no existe pérdida ni ganancia de material genético; o **desbalanceadas, desequilibradas o asimétricas** si existe pérdida o ganancia adicional del mismo. En general, las primeras no provocan consecuencias graves para la salud con la excepción de casos raros donde uno de los puntos de ruptura daña un gen funcional importante. Sin embargo, portadores de rearrreglos balanceados frecuentemente tienen un riesgo importante de producir hijos con su complemento cromosómico desbalanceado. En el caso de los rearrreglos desbalanceados, la pérdida o ganancia de material cromosómico generalmente va acompañada de graves defectos del fenotipo como puede ser retardo mental, malformaciones múltiples y aborto espontáneo.

Se distinguen diferentes tipos de anomalías cromosómicas estructurales que difieren en su mecanismo de origen y momento del ciclo celular en que se producen. Las clasificaremos en tres grandes grupos:

- Anomalías tipo cromatídicas: ocurren en G2
- Anomalías tipo cromosómicas: ocurren en G1
- Anomalías durante la división celular

Anomalías tipo cromatídicas

Son aquellas alteraciones que surgen como resultado de una ruptura del ADN en la fase G2 del ciclo celular. Pueden involucrar a una o a las dos cromátides. No son importantes desde el punto de vista constitucional puesto que generalmente no se transmiten a las células hijas. Se las utiliza para estudiar el efecto de distintos agentes físicos o químicos sobre los cromosomas (citogenética toxicológica).

Anomalías tipo cromosómicas

Se producen por ruptura del ADN en el periodo G1 del ciclo celular, previo a la síntesis del ADN. Por lo tanto, siempre afectan las dos cromátides cuando se las ve en metafase. Pueden ser de diferentes tipos:

A- **Intracromosómicas**: cuando afectan a un único cromosoma. Dentro de estas tenemos:

A1- *Con una ruptura*:

A11- **Delección terminal** (se pierde un segmento terminal sin centrómero que se denomina fragmento acéntrico). Nomenclatura: 46,XY,del(9)(q34).

A2- Con dos rupturas (Fig 3.23):

A21- **Delección intersticial:** Ocurren dos rupturas en un mismo brazo cromosómico, se separa el segmento comprendido entre ellos (sin centrómero), y se vuelven a reunir los segmentos restantes. El fragmento intersticial que carece de centrómero es inestable y se pierde (fragmento acéntrico). Nomenclatura: 46,XX,del(5)(q13q33).

A22- **Anillo:** Se producen dos rupturas, se pierden los fragmentos acéntricos y se reúnen los extremos que contienen el centrómero. Nomenclatura: 46,XX,r(18)(q11.3q22).

A23- **Inversión pericéntrica:** Ocurre una ruptura en cada brazo, el segmento que contiene el centrómero gira 180 grados y se vuelve a reunir. Generalmente se produce un cromosoma con morfología distinta al que le dio origen. Nomenclatura: 46,XY,inv(11)(p12q14).

A24- **Inversión paracéntrica:** Igual al anterior pero las dos rupturas ocurren en el mismo brazo cromosómico. La porción invertida no incluye el centrómero y por tanto no hay cambio de la morfología cromosómica. Nomenclatura: 46,XY,inv(11)(q12q24).

A3- Con tres rupturas:

A31- **Inserción intracromosómica.** Un fragmento intersticial de un cromosoma se separa de su lugar original y se inserta en otra zona del mismo cromosoma donde se ha producido previamente otra ruptura. Nomenclatura: 46,XX,ins(2)(p13q21q31).

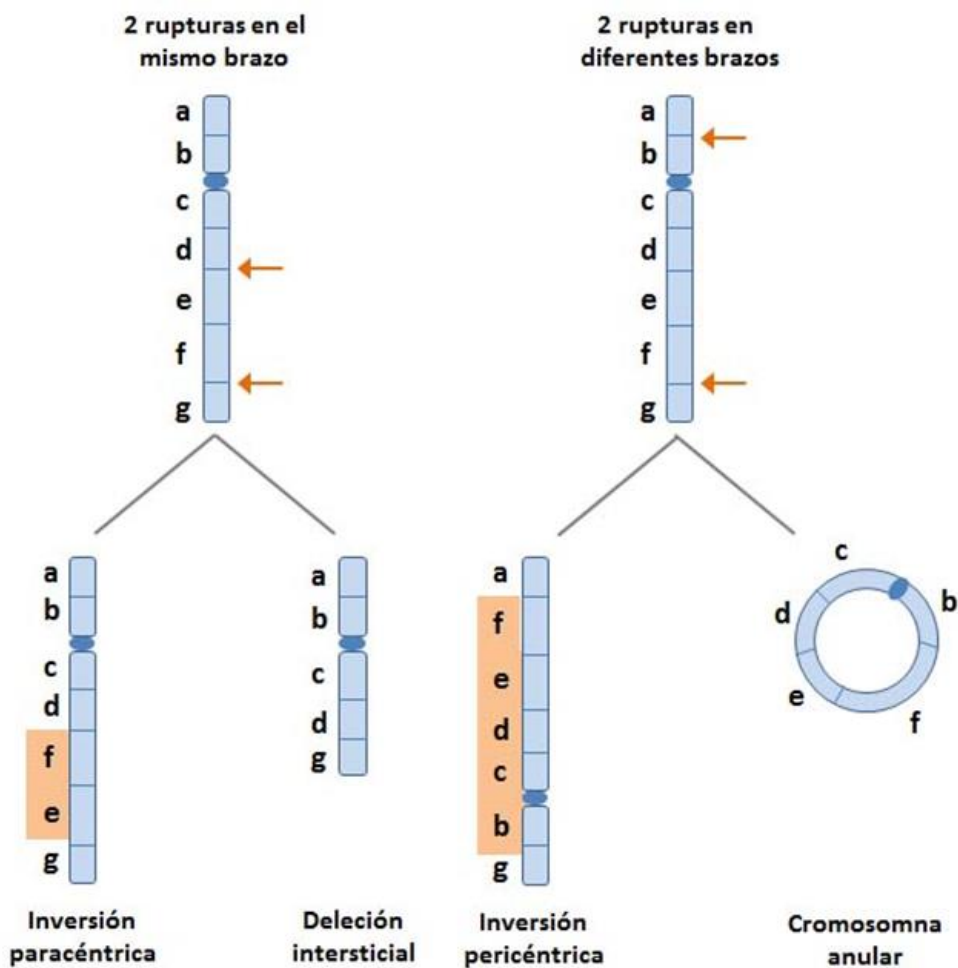


Figura 3.23. Anomalías intracromosómicas con dos roturas

B- Intercromosómicas entre cromosomas no homólogos: Ocurren cuando están involucrados dos o más cromosomas no homólogos.

B1- Con dos rupturas:

B11- Translocación recíproca: Ocurre una ruptura en cada uno de los cromosomas y luego se intercambian los fragmentos formando dos nuevos cromosomas denominados “derivados”. Nomenclatura: 46,XX,t(3;4)(q24;q26).

B12- Translocación robertsoniana: es un tipo especial de translocación recíproca en la cual los puntos de ruptura están localizados en o cerca de los centrómeros de dos cromosomas acrocéntricos. Nomenclatura: 45,XY,der(14;21)(q10;q10). q10 denota el centrómero.

B13- Dicéntrico: Ocurre una ruptura en cada cromosoma, los fragmentos acéntricos originados se pierden y se unen los segmentos restantes (cada uno con un centrómero), originando un cromosoma con dos centrómeros o dicéntrico.

B2- Con 3 rupturas:

B21- Inserción intercromosómica: Un cromosoma sufre dos rupturas en el mismo brazo, el fragmento intersticial se separa y se inserta en el otro cromosoma donde previamente ha ocurrido una ruptura.

B3- Con más de 3 rupturas:

B31: Rearreglos complejos: Hay más de dos cromosomas comprometidos y son muy poco frecuentes.

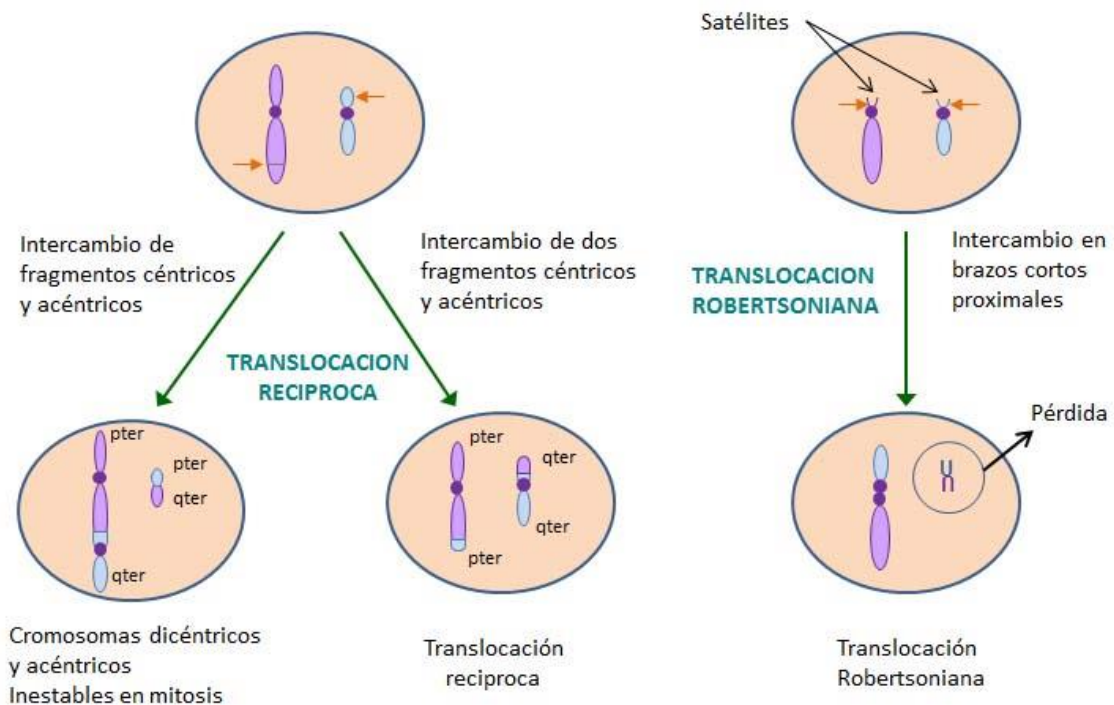


Figura 3.24. Esquema representativo de Translocaciones

C- **Intercromosómicas entre cromosomas homólogos:** Ocurren cuando están involucrados dos o más cromosomas homólogos.

C1- *Con dos rupturas:*

C11- **Duplicación:** Puede originarse por inserción de un segmento de un cromosoma en el homólogo.

C2- *Con tres rupturas:*

C22-**Dicéntrico:** Se produce una ruptura en cada homólogo, los fragmentos sin centrómero se pierden y hay reunión de los segmentos restantes originando un dicéntrico.

Anomalía por mala división del centrómero

Isocromosoma: Es un cromosoma anormal compuesto por dos brazos genéticamente idénticos. Se produce por una alteración durante la división celular a nivel del centrómero, donde las cromátides en lugar de separarse longitudinalmente lo hacen transversalmente (Fig. 3.25). Pueden ocurrir en mitosis o meiosis II.

El isocromosoma más frecuente es el del brazo largo del cromosoma X, i(Xq), que se encuentra presente en algunas mujeres con síndrome de Turner. También se han descrito para varios autosomas como el i(18p), i(12p), i(8p), etc. Se observan con frecuencia en cariotipo de tumores sólidos y displasias hematológicas.

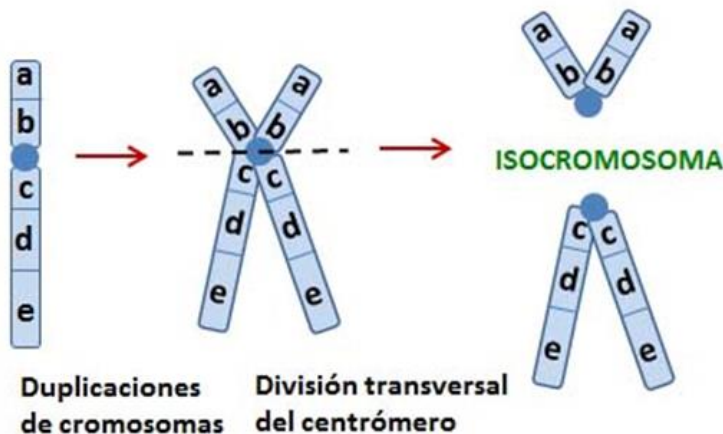


Figura 3.25. Esquema de formación de un isocromosoma

Las **translocaciones recíprocas** son generalmente balanceadas y relativamente frecuentes (1/1000). Como otros reordenamientos estructurales balanceados no suelen tener efecto fenotípico ya que toda la información genética está presente, a excepción de aquellos casos en los cuales un punto de ruptura pueda afectar a un gen importante, lo que se denomina **efecto de posición**. Sin embargo, constituyen una amenaza para la siguiente generación, porque es probable que los portadores de las mismas produzcan una alta frecuencia de gametos desequilibrados y por tanto tengan riesgo incrementado de tener descendencia anormal.

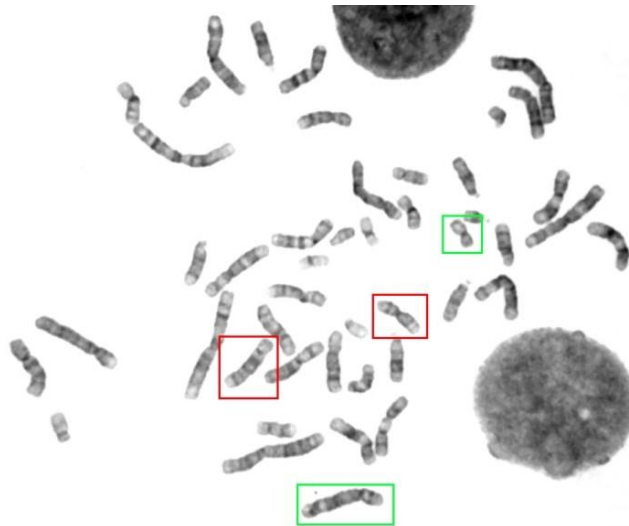


Figura 3.26

En la figura 3.26 se observa una $t(5;20)$ en un paciente con malformaciones múltiples producido probablemente por un efecto de posición originado en la translocación. Los cromosomas recuadrados en verde corresponden al 5 y 20 normal, mientras que los recuadrados en rojo corresponden a los cromosomas derivados.

Las translocaciones robertsonianas ocurren entre cromosomas acrocéntricos (pares 13, 14, 15, 21 y 22) (Fig 3.27). Los brazos cortos forman un cromosoma muy pequeño que generalmente se pierde en las siguientes divisiones celulares. Dado que estos contienen genes para ARN ribosomal y hay múltiples copias de ellos en los otros acrocéntricos, estas translocaciones no suelen tener efecto fenotípico. El número de cromosomas se reduce entonces a 45.

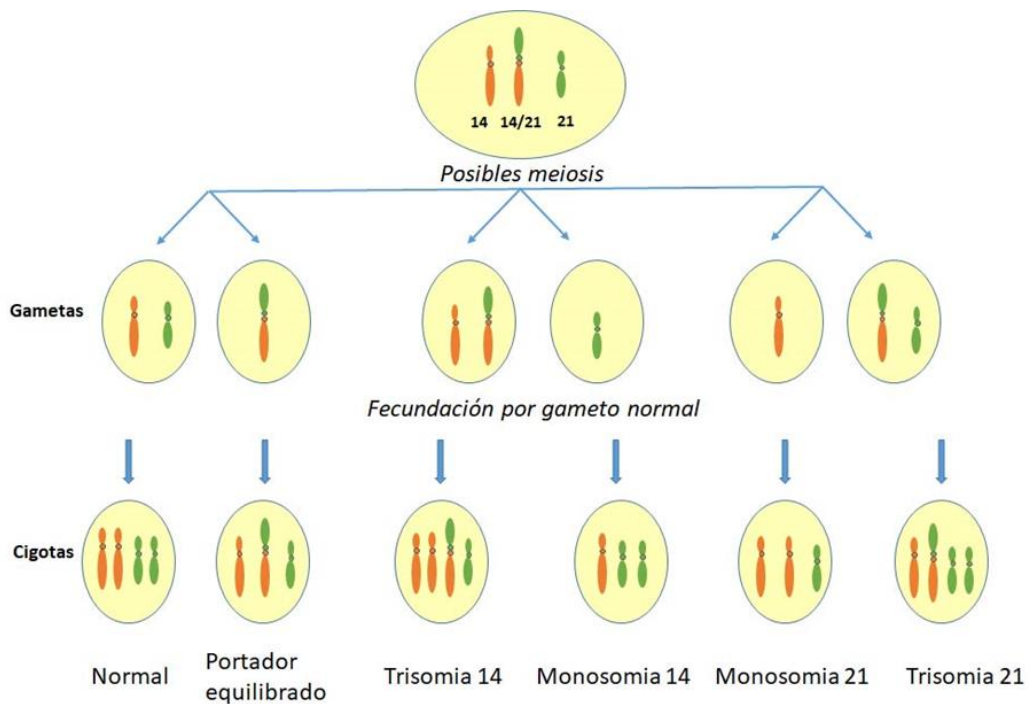


Figura 3.27. Posibles segregaciones de los cromosomas 14 y 21 de un portador 45,XY,der(14;21)(q10;q10)

En la figura 3.27 se muestra un esquema de los cromosomas 14 y 21 de un portador de una translocación robertsoniana 14,21 y su segregación durante la primera división meiótica. El individuo puede originar gametos, que después de la fecundación, pueden dar lugar a cigotos normales, portadores equilibrados como el progenitor, y cigotos desbalanceados anormales con trisomía 14 o 21, y monosomía 14 o 21. Estos no son viables y terminan en abortos espontáneos tempranos. Así, un portador de una translocación robertsoniana (y también ocurre con las translocaciones recíprocas) puede presentar alteraciones en la fertilidad teniendo abortos a repetición.

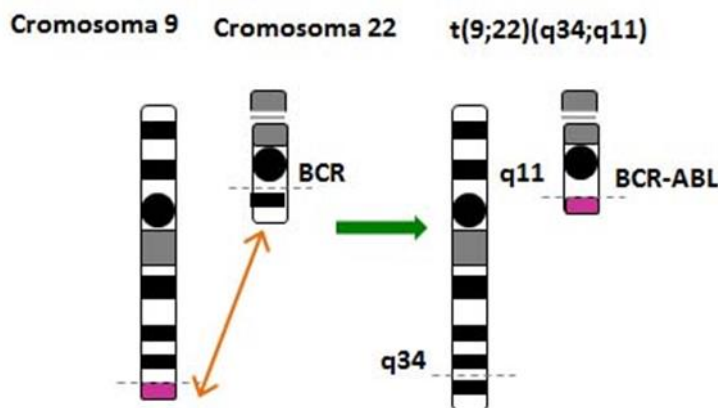


Figura 3.28. $t(9;22)(q34;q11)$ de la LMC

En la Fig 3.28, se observa una de los rearrreglos más importantes en el estudio de las displasias oncohematológicas. Se trata de una translocación entre un cromosoma 9 y uno 22 con puntos de ruptura en 9q34 y 22q11, característica de las células malignas de casi todos los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC). El cromosoma más pequeño (derivado de 22) se conoce con el nombre de cromosoma Philadelphia (Ph^1), y antes del advenimiento de las técnicas de bandeo se pensaba que era una delección del cromosoma 22.

A consecuencia de la translocación, se transfiere el oncogen *abl* del brazo largo del cromosoma 9 a la región del cromosoma 22 denominada *break point cluster* o *bcr*, resultando la transcripción de una proteína quimérica mayor que la proteína *abl* normal. Esta proteína anormal, a diferencia de la *abl* normal, posee actividad de tirosinasa, incrementada en células neoplásicas. Cuando el gen quimérico fue introducido en ratones normales se observó que estos desarrollaron alteraciones hematológicas malignas, incluyendo la LMC, lo cual demostró que el rearrreglo originado en el cromosoma Ph^1 provoca la enfermedad.

Síndromes de delección cromosómica

Generalmente son “*de novo*” y los puntos de ruptura variables reflejan una gama de mecanismos diferentes como la delección terminal o la intersticial de un segmento subtelomérico. Entre ellos se destacan los siguientes.

El **Síndrome del maullido del gato** o *cri du chat* presenta una frecuencia de 1/15,000 nacidos vivos. Se detecta una deleción del brazo corto de un cromosoma 5 (5p-). Su nombre deriva del sonido que emiten al llorar, similar al de un maullido de gato. Además de retardo mental, presentan microcefalia, hipertelorismo, inclinación antimongoloide de las fisuras palpebrales, pliegue epicántico, micrognatia, etc. La mayor parte de los casos son esporádicos pero un 15% son descendientes de portadores de translocación involucrando el cromosoma 5. El segmento delecionado puede ser terminal o intersticial, y puede variar entre los pacientes, pero pudo establecerse la región crítica en 5p15. Hoy en día hay sondas disponibles para estudiar por FISH la porción cromosómica involucrada.

El **Síndrome de Wolf-Hirschhorn** es una rara enfermedad genética causada por la microdeleción distal del brazo corto del cromosoma 4. La prevalencia es de 1/50,000 nacimientos. Las anomalías más comunes incluyen características faciales distintivas (microcefalia, puente nasal ancho y plano, frente alta, micrognatia, orejas malformadas), retraso mental, retraso del crecimiento, convulsiones, piel seca o moteada, anormalidades esqueléticas (escoliosis o cifosis), defectos cardíacos, genitourinarios, etc. Alrededor del 87% de los casos representan una deleción de novo, mientras que el 13% aproximadamente son heredados por una translocación cromosómica parental. La región delecionada por este síndrome suele estar en el extremo de 4p, y suele afectar varios genes que juegan un papel fundamental en el desarrollo temprano, aunque muchas de sus funciones específicas son aún desconocidas.

Síndromes de microdeleciones y duplicaciones

También se les ha aplicado el nombre de **síndrome de genes contiguos** ya que el fenotipo suele deberse a la presencia de copias extras o deleciones de muchos genes continuos incluidos en la región problema. El mapeo detallado de varios de estos trastornos ha demostrado que los puntos de rotura se encuentran en secuencias repetidas de bajo número de copias denominadas duplicaciones segmentarias. La recombinación anómala entre copias cercanas causa las deleciones o duplicaciones que suelen abarcar cientos a miles de kilobases, algunas veces visibles citogenéticamente. Veremos algunos ejemplos de ellos.

El **síndrome de Prader-Willi** es una enfermedad rara caracterizada por obesidad, polifagia, manos y pies pequeños, hipogonadismo y retraso mental.

El **síndrome de Angelman** (o síndrome de la marioneta feliz) tiene una prevalencia de 1/18,000 y presenta características bastantes diferentes al anterior: falta de coordinación de los movimientos (ataxia), retardo mental, ataques de risa sin motivo y convulsiones.

A pesar de ser dos patologías diferentes, se vio que en el 70% de los pacientes que presentan uno u otro síndrome podía detectarse una deleción intersticial del brazo largo de un

cromosoma 15 [del(15)(q11q13)]. Estudios posteriores mediante técnicas moleculares demostraron que en el síndrome de Prader-Willi la deleción ocurre en el cromosoma 15 de origen paterno; mientras que, por el contrario, en los individuos con síndrome de Angelman el cromosoma 15 delecionado es el de origen materno. Estudios en algunos pacientes afectados que no presentaron la deleción permitieron detectar que en el caso de Prader-Willi, los dos cromosomas 15 habían sido heredados de su madre; mientras que en los Angelman, los dos cromosomas 15 fueron de origen paterno. Este fenómeno se conoce con el nombre de disomía uniparental. Así, podemos ver que la pérdida de la región crítica 15q11-13 de origen paterno (ya sea por deleción o por disomía uniparental materna) causa Prader-Willi, mientras que la pérdida de la misma región crítica de un cromosoma 15 materno (por deleción o disomía uniparental paterna) causa Angelman.

Esta expresión diferencial de genes, dependiente del sexo del padre transmisor, se conoce con el nombre de *imprinting*. Suele asociarse con diferencias en los patrones de metilación del ADN, lo cual a su vez está relacionado con la regulación de la actividad transcripcional de los genes.

La técnica de FISH se puede usar para estudiar la región involucrada en los síndromes (15q11-13), utilizando una sonda para centrómero de 15, una sonda distal al centrómero (en otro color) como control (que hibridiza en ambos cromosomas 15), y la sonda específica de la región involucrada que hibridiza en uno solo de los cromosomas 15. Utilizando estas técnicas y comprobado esto en otras metafases, el paciente puede ser diagnosticado con microdeleción de la región 15q11-13.

El **Síndrome de Williams** es una enfermedad genética poco frecuente caracterizada por un trastorno del desarrollo, que asocia malformación cardíaca (estenosis aórtica supravalvular por lo general) en el 75% de los casos, retraso psicomotor, dismorfismo facial característico y perfil cognitivo y conductual específico. La incidencia al nacimiento de las formas típicas es de 1/20,000. La enfermedad es fácil de identificar durante la infancia. El perfil cognitivo está dominado por una deficiencia de las habilidades visoespaciales, que contrasta con un lenguaje correcto. Tienen conducta de tipo hipersocial, presentan hipersensibilidad al ruido y habilidades musicales. Está causado por una microdeleción cromosómica situada en q11.23 de uno de los cromosomas 7. No se detecta mediante un cariotipo convencional pero sí mediante FISH. Esta microdeleción, que generalmente se produce de forma esporádica, deriva en la supresión de varios genes, incluyendo el gen de la elastina. Para el estudio de este síndrome por FISH, se puede utilizar un kit que incluye una sonda de brazo largo distal al centrómero (por ej. en color verde) que se usa como control (que hibridiza en ambos cromosomas 7), y la sonda específica de la región involucrada (por ej. en color rojo) que se hibridiza en uno solo de los cromosomas 7. Comprobado esto en otras metafases, el paciente pudo ser diagnosticado con microdeleción de la región 7q11.23.

Deleciones y duplicaciones de la banda 22q11.2

En esta banda del cromosoma 22 se han detectado la presencia de varias deleciones y duplicaciones mediadas por recombinación desequilibrada entre duplicaciones segmentarias en esta región. Una microdelección relativamente frecuente (1/4,000) se asocia a los diagnósticos de **síndrome de DiGeorge, síndrome velo cardio facial y síndrome de anomalías conotruncales y de la cara**. Estos presentan una expresión variable debido a una microdelección de 3 Mb en 22q11.2. Los pacientes presentan anomalías cranofaciales, retardo mental, inmunodeficiencias y anomalías cardíacas; debido probablemente a la deleción de varios genes que se encuentran en esta región. Se cree que la deleción del gen TBX1 interviene en hasta un 5% de todas las cardiopatías congénitas.

El **Síndrome de duplicación de 22q11.2 o síndrome de ojos de gato** es mucho menos frecuente que la deleción del mismo segmento y da lugar a malformaciones dismórficas que afectan a varios órganos y están presentes desde el momento del nacimiento. Puede corresponder a una trisomía o tetrasomía. Entre ellas destaca la existencia de coloboma de iris de donde proviene el nombre de la afección, atresia anal, malformaciones del corazón y los riñones, aspecto facial característico y retraso mental. Existe una gran variabilidad en las manifestaciones y la gravedad de las mismas. Se produce un caso por cada 74,000 nacimientos, por lo que está considerada una enfermedad rara.

Resumen y conclusiones

- 1- Las anomalías cromosómicas se clasifican en numéricas y estructurales.
- 2- Pueden afectar a los autosomas o a los cromosomas sexuales.
- 3- Las anomalías cromosómicas pueden ser balanceadas o desbalanceadas.
- 4- El desbalance cromosómico se asocia a retardo mental y malformaciones congénitas generalmente graves.
- 5- Cuando el desbalance afecta sólo a los cromosomas sexuales los efectos en el fenotipo suelen ser menos graves que en el caso de los autosomas.
- 6- Si el desbalance es muy grave es incompatible con la vida y el embrión se aborta espontáneamente en algún momento temprano de la gestación.
- 7- Los portadores de anomalías cromosómicas balanceadas tienen en general fenotipo normal, pero pueden presentar alteraciones fenotípicas por efecto de posición.
- 8- Los portadores de anomalías cromosómicas balanceadas pueden transmitir una anomalía desbalanceada a su descendencia, y por tanto tener mayor chance de tener hijos con malformaciones o abortos espontáneos.

Referencias

- Hamerton John L. (1971). Human Cytogenetics, Clinical Cytogenetics Volume II. Academic Press, 2013.
- ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Karger.
- Nussbaum McInnes Willard. Thompson y Thomson. (2016). Genética en Medicina. Octava edición, Elsevier
- Rooney D. E. (2001) Human Cytogenetics Volume 1: Constitutional Analysis. A Practical Approach. Third Edition,.
- Scriver Charles, Arthur Beaudet, William Sly, David Valle, Barton Childs, Kenneth Kinzler, Bert Vogelstein. (2001)The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease, 8th edition, McGraw Hill.
- Strachan Tom, Read Andrew P. (2018)Human Molecular Genetics. Fifth edition. CRC Press.

CAPÍTULO 4

Síndrome de Down

Ana Laura Di Virgilio

Introducción

El síndrome de Down (SD) es el primer trastorno cromosómico clínicamente definido, y la principal causa genética comúnmente reconocida de retraso mental. La principal anomalía cromosómica que produce SD es una trisomía 21 (anomalía de tipo numérica) en donde existe una copia extra del cromosoma 21 (o una parte del mismo), en lugar de los dos cromosomas 21 habituales, caracterizado por la presencia de un grado variable de retraso mental y rasgos físicos peculiares. No se conocen con exactitud las causas que provocan el exceso cromosómico, aunque se relaciona estadísticamente con una edad materna superior a los 35 años. Las personas con SD tienen una probabilidad algo superior a la de la población general de padecer algunas patologías, especialmente de corazón, sistema digestivo y sistema endocrino.

Si bien el SD podría no ser considerada normalmente como una enfermedad metabólica, es, de hecho, una colección de varios trastornos metabólicos que se derivan de la presencia de genes adicionales y, como un resultado, de cantidades adicionales de los productos de estos genes. En la actualidad existen avances en el estudio los procesos bioquímicos subyacentes al retraso mental, sin embargo, no existe hasta la fecha ningún tratamiento farmacológico que haya demostrado mejorar las capacidades intelectuales de estas personas. Las terapias de estimulación precoz y el cambio en la mentalidad de la sociedad, por el contrario, sí están suponiendo un cambio cualitativo positivo en sus expectativas de vida.

Historia

El primer informe documentado de un niño con SD se atribuye a Étienne Esquirol en 1838, quien lo denominó “cretinismo” o “idiocia furfurácea”. En 1886, Martin Duncan describió a una niña de cabeza pequeña, redondeada, con ojos achinados, que dejaba colgar la lengua y apenas pronunciaba unas pocas palabras. En ese año el médico inglés John Langdon Down describió a un grupo de pacientes del Asilo para Retrasados Mentales de Earlswood, en Surrey. Este estudio detalla en forma pormenorizada las características físicas de este grupo de pacientes.

En 1909, G. E. Shuttleworth menciona por primera vez la edad materna avanzada como un factor de riesgo para la aparición del síndrome. En cuanto a su etiología, en el año 1932 se hace referencia por vez primera a un reparto anormal de material cromosómico como posible causa del SD. En 1956 Tjio y Levan demuestran la existencia de 46 cromosomas en el ser humano y poco después, en el año 1959 Lejeune, Gautrier y Turpin demuestran que las personas con SD presentan 47 cromosomas y que la alteración se encuentra en el par de cromosomas 21.

Aspectos clínicos

Características dismórficas

Las características clínicas más importantes del síndrome de Down incluyen varias malformaciones menores o características dismórficas que, aunque no todas están necesariamente presentes, constituyen el aspecto físico distintivo del síndrome.

La Tabla 4.1 enumera estas características y las frecuencias en el SD.

Tabla 4.1. Características dismórficas y su frecuencia en el DS

Características dismórficas	Frecuencia %
Hendidura palpebral oblicua	82
Piel suelta en cuello	81
Paladar angosto	76
Braquicefalia	75
Hiperflexibilidad	73
Puente nasal aplanado	68
Dedos de los pies separados	68
Manos anchas y cortas	64
Cuello corto	61
Dientes anormales	61
Pliegue epicanto	59
Dedo meñique corto	58
Boca abierta	58
Manchas de Brushfield	56
Lengua arrugada	55
Pliegue palmar transversal	53
Oreja doblada o displásica	50
Lengua sobresaliente	47

El análisis cuantitativo cefalométrico se ha utilizado para describir las anomalías craneofaciales. Es importante destacar que además de las características descritas en la Tabla 4.1, suelen manifestarse durante la vida cataratas y queratocono (patología degenerativa de la córnea). Un individuo puede tener muchas de estas características y ser reconocido como SD, pero ninguna de éstas está presente en el 100% de los pacientes. Asimismo, es raro que un individuo con SD manifieste la totalidad de las características dismórficas. Por otro lado, la presencia de una o algunas características no implica que exista una alteración cromosómica.

Además de las características enumeradas en la Tabla 4.1, hay una serie de descubrimientos dermatoglíficos que son bastante características del SD. Estas solían desempeñar un papel mucho mayor en el diagnóstico clínico que actualmente, sin embargo, representan aspectos distintivos del fenotipo del SD. Particularmente característicos son el arco tibial y el triradio axial palmar axial. Estas características, junto con la longitud de la oreja (corta), la distancia entre el primer y el segundo dedo del pie (ancho), la presencia de manchas de Brushfield alrededor del iris y el pliegue de la piel excesivo en el cuello se pueden usar para construir un índice capaz de permitir el diagnóstico del 95 por ciento de los pacientes en los que se sospecha el SD, con una precisión del 99.9 por ciento. En este sentido, es interesante destacar que de los niños con sospecha clínica de SD, solo alrededor del 75 al 85 % en realidad presentan la trisomía 21.

Retraso mental

El retraso mental está prácticamente siempre presente en el SD. El cerebro es el órgano más vulnerable a los efectos nocivos de una aneuploidía autosómica, sea cual sea el cromosoma involucrado. Existen alteraciones tanto en la estructura como en la función del cerebro de las personas con SD, las cuales aparecen en las primeras etapas de la vida y se mantienen, e incluso pueden ser incrementadas, con el transcurso de los años. Como es lógico, interesa conocer de manera particular la influencia que ejerce sobre el desarrollo inicial de los circuitos cerebrales, ya que este desarrollo va a condicionar el establecimiento y la consolidación de las conexiones y redes nerviosas necesarias para que se establezcan con plenitud los mecanismos de la atención, de la memoria, de la capacidad para la correlación y el análisis, del pensamiento abstracto, etc.

Además de los efectos sobre la inteligencia, la trisomía 21 también está asociada a un proceso de degeneración neuronal progresivo durante la edad adulta. Este proceso, que es patológicamente idéntico a la enfermedad de Alzheimer (EA) (demencia presenil y / o senil), produce cambios patológicos significativos en el cerebro y puede comprometer aún más el funcionamiento mental ya deteriorado.

En el SD, ciertos indicadores del desarrollo (como sonreír, mantener la cabeza erguida, decir las primeras palabras, etc) se vuelven cada vez más retrasados a medida que pasa el tiempo. A los 2 meses de edad el retraso es de 2 meses y a los 2 años es de 1 ó 2 años. En individuos institucionalizados se observó que existe un progreso continuo en la primera década de la vida, luego una meseta de la edad mental y por último una caída del desarrollo intelectual. Por otro lado, existe una caída progresiva del coeficiente intelectual desde el primer año de vida, que

muestran amplia variabilidad entre los individuos de la misma edad. Esta variabilidad se debe a factores genéticos intrínsecos, propios de cada individuo, y factores ambientales, dados por las prácticas sociales y de educación

Deterioro cognitivo

En mayor o menor grado, suelen existir en las personas con SD, problemas relacionados con el desarrollo de los siguientes procesos:

- Los mecanismos de atención, el estado de alerta, las actitudes de iniciativa
- La expresión de su temperamento, su conducta, su sociabilidad
- Los procesos de memoria a corto y largo plazo
- Los mecanismos de correlación, análisis, cálculo y pensamiento abstracto
- Los procesos de lenguaje expresivo

Los datos actuales permiten afirmar que la mayoría de las personas con SD funcionan con un retraso mental de grado ligero o moderado. Existe una minoría en la que el retraso es tan pequeño que se encuentra en el límite de la normalidad, y otra en la que la deficiencia es grave, pero suele ser porque lleva asociada una patología añadida de carácter neurológico, o porque la persona se encuentra aislada y privada de toda enseñanza académica.

Este cambio se debe tanto a los programas específicos que se aplican en las primeras etapas (estimulación, intervención temprana), como a la apertura y enriquecimiento ambiental que, en conjunto y de manera inespecífica, está actuando en la sociedad actual sobre todo niño, incluido el que tiene SD. Algunos estudios longitudinales, demostraron que no necesariamente se produce un deterioro o regresión al pasar a edades superiores cuando la acción educativa persiste. El coeficiente intelectual puede disminuir con el transcurso del tiempo, en especial a partir de los 10 años. Pero la utilización de la edad mental ayuda a entender mejor el paulatino enriquecimiento intelectual de estos alumnos, puesto que dicha edad mental sigue creciendo, aunque a un ritmo más lento que la edad cronológica. Sabemos que, cuando se tienen en cuenta estas características y se ajusta consiguientemente la metodología educativa, mejorando las actitudes, adaptando los materiales y promoviendo la motivación, los escolares con SD son capaces de aprender mucho y bien; ciertamente, bastante más de lo que hasta hace unos años se creía.

Anormalidades neurológicas

Las causas específicas del retraso mental no se han dilucidado, aunque se sabe que la densidad de las células nerviosas está disminuida, de que existen los cambios en la composición de los fosfolípidos y alteraciones en ciertas propiedades electrofisiológicas del cerebro y neuronas aisladas. Los cambios patológicos, metabólicos y neuroquímicos de la enfermedad de Alzheimer están presentes después de la tercera década en los cerebros de todas las personas con SD, que también tienen una pérdida progresiva en las funciones cognitivas. Muchos desarrollan una demencia franca.

Neuropatología: Como tantos otros aspectos del SD, ha habido un considerable desacuerdo sobre la frecuencia y la naturaleza de las anomalías anatómicas del cerebro. Sin embargo, el

consenso actual es que en la mayoría de los pacientes con SD presentan resultados neuropatológico normales. Aunque los hallazgos histológicos han sido inconsistentes, el peso del cerebro está en el rango bajo-normal, y el tamaño del cerebelo y el tronco cerebral pueden ser reducidos incluso en mayor medida. La longitud frontal-occipital se acorta, secundaria al crecimiento reducido del lóbulo frontal. Existe una disminución y/o anomalía de las dendritas en lactantes y niños con SD, que continúa hasta la edad adulta, y se vuelve aún más pronunciada cuando se desarrolla EA.

También se ha reportado otra evidencia de defectos en la histogénesis cerebral. Esto incluye una pobreza de células granulares a lo largo de la corteza y densidades neuronales disminuidas en las capas II y IV de la corteza occipital (área 17) en individuos que varían de recién nacidos a 14 años.

En los bebés pequeños, las capas celulares de la corteza visual están mal definidas, y la disminución en el número de neuronas hipotalámicas también ha sido observada. Aunque hay evidencia acumulada de anomalías de diferenciación neuronal y migración en cerebros fetales e infantiles, no es seguro si se toma en cuenta la plasticidad del desarrollo del cerebro joven, cuántos de los cambios son permanentes o funcionalmente significativos.

Neuroquímica: Se ha reportado que todos los fosfolípidos de la mielina contienen cantidades reducidas de ácidos grasos monoinsaturados, pero no tienen cantidades anormales de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Lo opuesto, sin embargo, parece ser cierto para los fosfolípidos sinaptosómicos, con proporciones reducidas de PUFA y cantidades normales de ácidos grasos monoinsaturados. Los ácidos grasos monoinsaturados se reducen en esfingomielina. También se observaron proporciones anormales de fosfoglicéridos en los cerebros fetales con SD, y se especuló que estas alteraciones pueden dar lugar a anomalías de la membrana y, en consecuencia, a trastornos funcionales.

Neurofisiología: No hay patrones específicos de EEG asociados con el SD, sin embargo, se ha sugerido que hay un desarrollo postnatal incompleto de las interconexiones neuronales o una inmadurez del desarrollo cerebral. Estas conclusiones se consideraron consistentes con las descritas con los hallazgos histológicos de anormalidades dendríticas mencionadas anteriormente. La función neuronal en los individuos con SD sobre potenciales visuales y auditivos es anormal. Las respuestas anormales se han atribuido a alteraciones tanto estructurales como neuroquímicas. Se han realizado estudios funcionales de las neuronas de fetos con SD. Las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal fetal se cultivaron in vitro, y se encontró que varios parámetros fisiológicos fueron alterados. Se postuló que existe mayor tasa de despolarización de las neuronas trisómicas observada en reposo debido a la activación de canales de sodio. Se ha especulado que anormalidades similares pueden ocurrir en las neuronas del sistema nervioso central y podrían ser la base neurológica del retraso mental en SD.

Hipotonía muscular

Una de las características más importantes en recién nacidos y niños con SD de hasta un año de vida es la hipotonía muscular, es decir, tienen un tono muscular por debajo de 3 desvíos estándar de lo normal que luego se normaliza. Las causas que la ocasionan no se conocen con exactitud, pero se han propuesto algunas teorías tales como el déficit de serotonina plasmática, anomalías intrínsecas de las fibras musculares, así como un trastorno neurológico central, siendo esta última la más probable

Enfermedad de Alzheimer

La posibilidad de una relación entre SD y EA ha sido reconocida por más de 50 años. Diferentes informes mostraron que los cerebros de los adultos con SD poseen los rasgos patológicos y neuroquímicos de la EA. Los análisis morfométricos detallados sugieren que los cambios patológicos encontrados en el cerebro adulto del SD puede diferir cuantitativamente de los encontrados en la EA, pero el orden de la progresión de las áreas involucradas parece ser la misma.

En una extensa serie de autopsias, que incluyó 347 casos de SD, 5 de 312 (1,6 por ciento) cerebros de individuos que murieron antes de 40 (20 a 38 años) y 35 de 35 (100 por ciento) de individuos mayores de 40 años (42 a 69 años) tuvieron cambios patológicos generales de EA. De estos últimos, el 60 por ciento se describió como grave y comparable a la mayoría de los casos avanzados de EA. En todos los casos de individuos mayores de 30 años se encontraron placas seniles y ovillos.

En base a estudios inmunocitoquímicos se afirma que la deposición de la proteína amiloide β /A4 en los cerebros de personas con SD comienza 50 años antes que en los cerebros normales, posiblemente como resultado de la sobreexpresión del gen de la proteína precursor amiloide (APP).

Malformaciones congénitas

La anomalía congénita más frecuente en el SD es la cardiopatía congénita, y ocurre en aproximadamente el 40 por ciento de los individuos afectados. Las lesiones cardíacas en los niños afectados abarcan anomalías en el canal atrioventricular, defectos en el tabique ventricular y atrial, tetralogía de Fallot (afección poco frecuente que se produce a causa de una combinación de cuatro defectos cardíacos presentes al momento del nacimiento y que afecta la estructura del corazón). A pesar de la variedad de las lesiones, se cree que la mayoría representan variaciones de un problema común en la formación en el flujo venoso hacia el corazón. Por otro lado, existe un desarrollo anormal del parénquima pulmonar y vasculatura pulmonar, lo que lleva a la hipertensión pulmonar. Además, se puede presentar hipoplasia pulmonar por la disminución del número de alvéolos y reducción del área alveolar.

Aunque es mucho menos común que la cardiopatía congénita, existe una mayor frecuencia de anomalías intestinales (alrededor del 5 por ciento) específicas en el SD. La lesión más característica es la estenosis o atresia duodenal, a veces con páncreas anular, seguida de ano imperforado, enfermedad de Hirschsprung y fístula traqueoesofágica o atresia esofágica

Aumento de frecuencia de leucemias

Hay un aumento de quince a veinte veces en la incidencia de leucemias en niños con SD. En neonatos y niños menores de un año es predominante la leucemia no linfoblástica aguda (LNLA), pero a partir de los 3 años de edad, la distribución de los tipos es la misma para sujetos SD y no SD.

La edad de inicio de LNLA es más baja en pacientes SD que en individuos diploides, pero las edades son las mismas para la leucemia linfoblástica aguda (LLA). La supervivencia de las personas con SD después del diagnóstico de LLA es más corta que la de individuos diploides.

Por otro lado, la leukemia megacarioblástica es más común en individuos SD. Se ha estimado que entre el 20 a 40% de todos los casos de leucemias agudas y reacciones leucemoides o leucemias transitorias son de este tipo. Es más, este tipo de leucemias ocurren mayoritariamente en individuos trisómicos o mosaicos trisomía 21/2n y es 200-400 veces mayor en SD que en la población general.

Las reacciones leucemoides o la leucemia transitoria ocurren en los bebés, al igual que la macrocitosis y aumento del hematocrito.

En cuanto a la respuesta al tratamiento, la remisión está reducida y la mortalidad está aumentada para LLA en individuos SD.

Alteraciones de respuesta inmune

Los individuos SD son más susceptibles a una variedad de enfermedades infecciosas y al desarrollo de leucemias. Las infecciones constituyen la principal causa de muerte después de los 10 años. Aunque existe controversias con respecto a la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, se ha demostrado niveles aumentados de IgG en pacientes mayores, mientras que en los recién nacidos se encuentran disminuidos. Los valores de IgA e IgM pueden estar bajos, normales e incluso aumentados. Estudios sobre linfocitos T mostraron que son escasos, aunque la proporción entre T y B en niños SD permanece normal. Se ha sugerido que el timo es incapaz de liberar células T maduras y funcionales debido a una anormal maduración en los timocitos y desregulación de citoquinas, iniciado por un aumento de la sensibilidad al interferón gamma.

Alteraciones hematológicas

Los individuos SD presentan macrocitosis con un volumen corpuscular medio aumentado (11-14%). Las actividades de varias enzimas en eritrocitos están aumentadas, aunque se desconoce la causa ya que ninguna se encuentra codificada por los genes del cromosoma 21. En linfocitos y granulocitos muchas enzimas como fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa también se encuentran aumentadas.

Hiperuricemia

Se ha reportado niveles de ácido úrico elevados en el 44% de los pacientes trisómicos. La hiperuricemia es el resultado de una sobreproducción de purinas, así como el aumento de la degradación de purinas por un recambio leucocitario aumentado.

Anormalidades endócrinas

Disfunción tiroidea y autoinmunidad. Se han reportado casos tanto de hipertiroidismo como de hipotiroidismo. Existen estudios que afirman que hay incremento de anticuerpos tiroideos dependientes con la edad. La causa es desconocida, pero se especula a que estas anomalías tiroideas se deben en parte a las anomalías de la función inmunológica

Diabetes. La prevalencia a desarrollar Diabetes Mellitus tipo I es mayor en la población SD que en la diploide.

Crecimiento y estatura. Por lo general los individuos SD son más bajos. La altura promedio está reducida en 1,5 desviación estándar en mujeres y 0,5 en varones al nacer y llega a ser de 3 desviaciones estándar a la edad de 3 años. Las extremidades inferiores son desproporcionalmente cortas y la velocidad de crecimiento se ve disminuida en todas las edades. La circunferencia de la cabeza está reducida.

La hormona de crecimiento es normal pero el factor de crecimiento insulino-símil tipo 1, está aumentado en los dos primeros años de vida.

Reproducción. Los varones con SD son casi siempre infértiles por defectos en la espermatogénesis, mientras que las mujeres, aunque disminuyen en fertilidad, a menudo son capaces de reproducirse.

Fisiopatología**Las bases cromosómicas del SD**

El SD es la manifestación fenotípica de la trisomía 21. Una trisomía es la alteración cromosómica (numérica) en la que hay 3 copias de un cromosoma concreto en las células. Asimismo, la trisomía 21 es una aneuploidía autosómica que es el estado en el que existe un número irregular de cromosomas (a diferencia de la euploidía que significa que las células poseen juegos completos de cromosomas). El fenómeno por el cual se origina esta aberración cromosómica se denomina no disyunción por el cual no se separan los cromosomas homólogos en la anafase de la meiosis I para ir cada componente de la pareja a la célula hija correspondiente (Fig. 4.1). Otras veces se debe al fracaso de separación de las cromátidas hermanas en la meiosis II para originar los gametos (óvulos y espermatozoides).

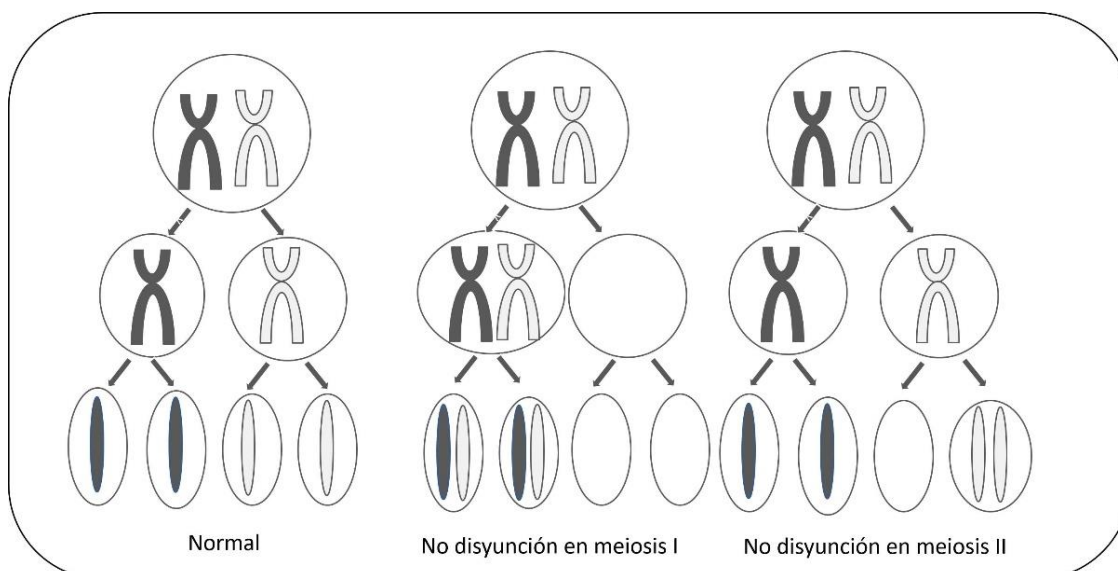


Figura 4.1. Esquemas para la no disyunción en meiosis I (centro) y en meiosis II (derecha) comparadas con la disyunción normal (izquierda).

La no-disyunción relativa a un cromosoma en la meiosis origina un reparto anómalo de cromosomas: de los 46 originales, 24 irán a un gameto y 22 a otro (en lugar de 23 a cada uno). Tras la fertilización por un gameto normal, se formará un cigoto trisómico o monosómico (no viable). Puesto que la no-disyunción del cromosoma 21 puede aparecer en cualquiera de los gametos, el origen del síndrome de Down puede ser tanto paterno como materno. Pero se ha comprobado que el origen de la trisomía 21 se debe mayoritariamente a que la no-disyunción tiene lugar en el óvulo (93 % de los casos).

Si bien la aberración cromosómica más frecuente en el SD es la que se da por la presencia de una copia adicional del cromosoma 21 como un cromosoma libre, también puede ocurrir como parte de un cromosoma robertsoniano (rob) o cromosomas de fusión o, en raras ocasiones, como parte de una translocación recíproca. Una translocación recíproca es una aberración cromosómica estructural en donde se produce una fractura en dos cromosomas y un intercambio de los fragmentos (Fig 4.2). Cuando los cromosomas acrocéntricos, es decir los cromosomas del grupo D (pares 13, 14 y 15) y del grupo G (pares 21 y 22) están involucrados, se trata de una translocación robertsoniana.

Por otro lado, en un 2 a 4% de los casos hay mosaicismo en donde existen dos poblaciones de células, una diploide y una trisómica. El número y la distribución de células trisómicas son suficientes para hacer que se manifieste el fenotipo SD.

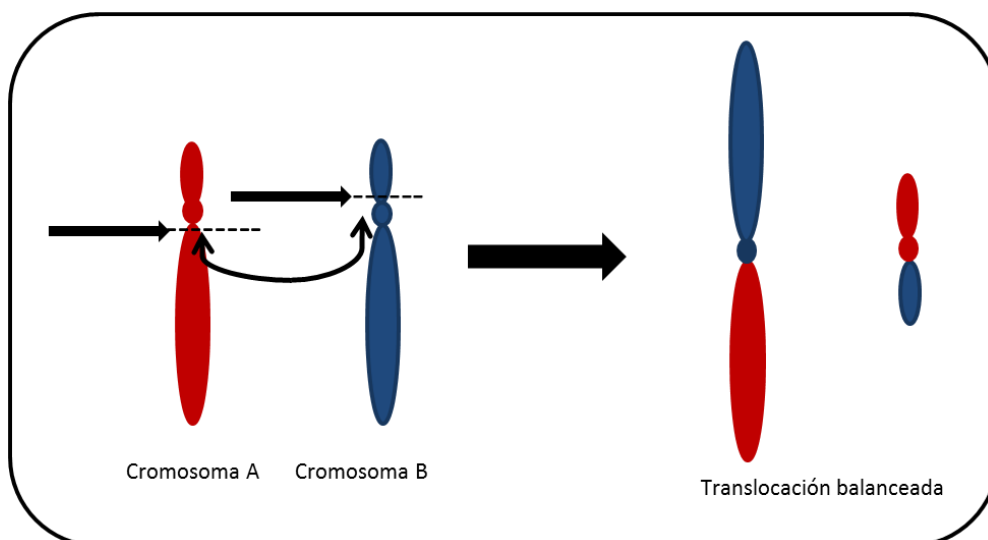


Figura 4.2. Representación esquemática de una translocación recíproca balanceada

Las proporciones de las diversas formas citogenéticas de la trisomía 21 se muestran en la Tabla 4.2. Como puede verse en estos datos, la gran mayoría de los casos son 47, + 21, y las otras categorías constituyen 5 por ciento cada una.

Tabla 4.2. Proporción de anomalías citogenéticas

Anormalidades citogenéticas	Proporción (%)
47,+ 21	89,3-93,0
Mosaicismo 47,+21/46	1,0-3,7
Translocaciones robertsonianas	
46,-14,+rob(14;21)	1,5-3,4
46,-13,+rob(13;21)	0,1-0,6
46,-15,+rob(15;21)	0,2-0,6
46,-21,+rob(21;21)	1,6-2,1
46,-22,+rob(21;22)	0,1-0,3
Translocaciones recíprocas	0,2-0,3

Los datos en la Tabla 4.2 representan las medias para todos los casos de SD, independientemente de la edad materna. La frecuencia de 47, + 21 es una función de la edad materna, mientras que las otras formas de SD que producen aneuploidía no lo son.

Aproximadamente el 40-45% de los casos asociados a translocaciones robertsonianas entre el cromosoma 21 y uno de los cromosomas del grupo D (es decir, los cromosomas 13 a 15) son

familiares, ya que se heredan el cromosoma de fusión de un progenitor citogenéticamente equilibrado del genotipo 45, -D, -21, + rob (D; 21). Los individuos SD son 46, -D, + rob (D; 21). En la Fig. 4.3 se describe este mecanismo. Para las translocaciones robertsonianas del grupo G, solo alrededor del 4% son familiares.

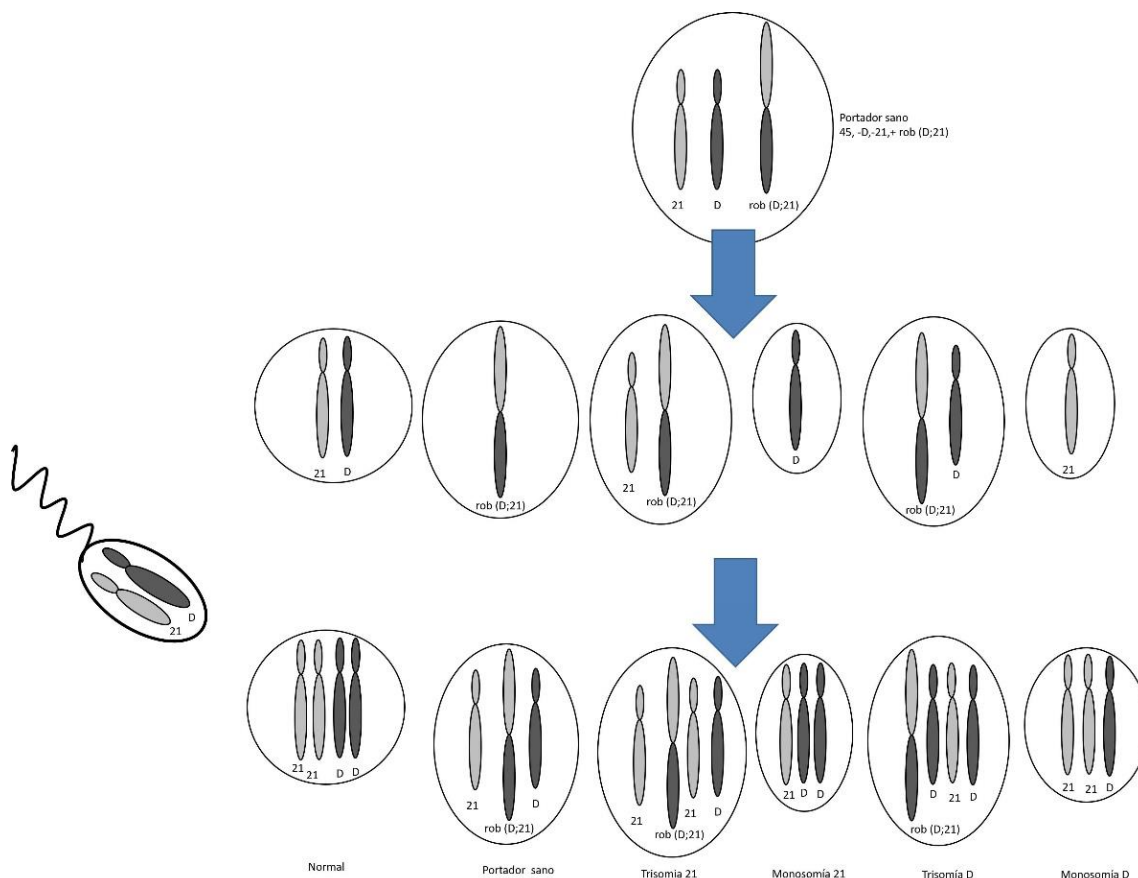


Figura 4.3. Representación esquemática de la gametogénesis en un individuo portador sano de una translocación robertsoniana (45, -D, -21, + rob (D; 21)) que puede dar origen a un individuo SD (46, -D, + rob (D; 21)).

Las anomalías citogenéticas que se acaban de describir involucran la mayoría o la totalidad del cromosoma 21, ya sea libre o como parte de un cromosoma de fusión robertsoniano (en cuyo caso solo el brazo largo, 21q, está presente en una copia adicional). Sin embargo, hay, como se ha señalado, casos raros en los que solo se triplica parte del brazo largo del cromosoma, y tales casos se han utilizado para definir la región del cromosoma 21 responsable del fenotipo DS.

Efecto de la edad materna en la incidencia del SD

El riesgo de tener un hijo con SD aumenta con la edad materna. Asimismo, la distribución de la edad materna en la población de mujeres que tienen hijos es el principal determinante de la incidencia general de SD. Se han realizado diversas estimaciones de la incidencia de SD en la población de recién nacidos, y la mayoría de las cifras están en 1 por cada 1000 nacidos vivos.

La incidencia aumenta con la edad materna de tal manera que a los 20 años la incidencia es de 1 en 1700 y a los 45 años es de 1 en 30. Por otro lado, hay una sugerencia de que la tasa es ligeramente superior para las madres menores de 20 años edad. En general, la tasa de aumento de SD muy gradualmente de una forma lineal, aproximadamente 0,04 a 0,05 por 1000 por año hasta aproximadamente hasta los 30 a 31 años. Entonces hay un cambio aparentemente más abrupto a un patrón exponencial de aumento. No está claro si esto representa un verdadero cambio en los mecanismos responsables de no disyunción o en realidad se deriva a partir de dos procesos, uno constante, y una exponencial, que coexisten a lo largo de los años de maternidad.

Las estimaciones de la incidencia de SD en la población de recién nacidos están subestimadas. Las tasas observadas de SD en recién nacidos son de dos tercios en comparación a las observadas en los fetos monitoreados mediante amniocentesis. Estas diferencias son atribuibles en su totalidad o en parte a la muerte fetal que lleva a un aborto espontáneo entre el momento en que se realiza la amniocentesis y el nacimiento. En una encuesta de embarazos en la que se detectaron fetos 47, +21 entre la 16ta y 18va semana de gestación, más del 20% de los fetos con SD murieron in útero. Cuando las frecuencias observadas en la amniocentesis se comparan con las encontradas en las vellosidades coriónicas tomando muestras en la 10ma semana de gestación, el 21% de los fetos afectados murieron entre estos dos puntos temporales. En general, se estima que alrededor del 30% de los fetos con SD llegan a término.

Se han planteado diferentes hipótesis sobre las causas de la dependencia con la edad materna, aunque se debe recordar que tanto factores dependientes de la edad e independientes de la edad pueden estar operando simultáneamente:

Envejecimiento del ovocito, es la hipótesis que sostiene que los eventos acumulativos, ya sean intrínsecos o ambientales conducen a un daño en la meiosis, y, a su vez, a la no disyunción. Tales eventos podrían ser el daño sobre las fibras del huso o sus componentes, o una acumulación de los efectos de la radiación, desequilibrios hormonales o infecciones.

La fertilización retrasada debido al "envejecimiento" del óvulo después de la ovulación, podría ser responsable de la no disyunción con dependencia de la edad materna

Por otro lado, el envejecimiento del esperma y de los espermatozoides en el tracto reproductivo masculino, en parejas mayores, es responsable del efecto de la edad materna en los casos de SD en los que el cromosoma 21 adicional deriva del padre.

La hipótesis de la línea de producción está basada en estudios en ratones, y establece que los ovocitos con un mayor número de quiasmas se forman antes durante la embriogénesis y se ovulan antes en la vida adulta que los ovocitos con menos quiasmas. Una disminución en los quiasmas daría lugar a una mayor frecuencia de no disyunción.

En contraste con todas las hipótesis anteriores, que operan a nivel de eventos prezigóticos asociados con meiosis, la quinta hipótesis principal es que existe una disminución en la tasa de aborto de embriones aneuploides. Sin embargo esta hipótesis no es apoyada por el hecho que no se encuentra un efecto en la edad materna para el SD de las translocaciones robertsonianas y el hecho que tampoco se encontraron casos de mosaicismo por trisomía 21 / 2n.

Diagnóstico

El diagnóstico prenatal para detectar embarazos de fetos con SD se basa actualmente en 2 tipos de pruebas diagnósticas:

- a) Las pruebas de sospecha o presunción, de naturaleza no invasiva, y que no conllevan riesgo de aborto.
- b) Las pruebas de confirmación, de naturaleza invasiva, mediante las cuales se obtienen células fetales con las que se realiza el cariotipo. Estas técnicas están asociadas a un determinado riesgo de aborto.

Dentro de las *pruebas de sospecha* se pueden realizar:

Pruebas bioquímicas en suero materno: consiste en medir una serie de hormonas y proteínas que se encuentran en suero materno que varían si el feto tiene problemas cromosómicos o del desarrollo y, a su vez dependen de la edad gestacional. Este test se realiza entre las semanas 15 a 20 y no existe ningún riesgo de aborto. Se miden alfa fetoproteína (AFP), sintetizada en hígado fetal y saco vitelino, sus niveles se encuentran disminuidos en el SD en un 30%; gonadotropina coriónica humana (hCG), sintetizada en placenta, sus niveles se encuentran aumentados en el SD (en un 50% de los embarazos con SD); Estriol no conjugado o Estriol libre, sintetizado en adrenales, hígado y placenta, sus niveles están disminuidos en el SD en un 30%. Este triple test tiene una sensibilidad del 60-70%. Cuando se mide inhibina A, una proteína de placenta que en fetos con SD muestra niveles aumentados, la sensibilidad del método (test cuádruple) llega al 75-80%.

Esta prueba presuntiva no tiene valor diagnóstico definitivo. Con el resultado se obtiene un valor probabilístico que incluye los datos de la edad gestacional como la edad cronológica de la madre. El valor presuntivo debe luego confirmarse por la existencia real de la trisomía 21 analizada por el cariotipo.

En la actualidad existen diferentes estrategias para la detección neonatal del SD, en el 1er trimestre o 2do trimestre (Fig. 4.4).

1er trimestre (11-14 semanas de gestación)

- PAPP-A Estará ↓ en SD (0,4 MdM)
- β-hCG libre Estará ↑ en SD (1,8 MdM)
- Medida de la translucencia nucal (ultrasonografía) (distancia entre la piel y la espina cervical)

La capacidad de detección es del 86%. MdM significa la concentración expresada como un múltiplo de la mediana, obtenida esta última de un grupo control de mujeres con fetos no afectados, y de la misma edad gestacional.

2do trimestre (16-18 semanas de gestación)

- AFP Estará ↓ en SD (0,8 MdM)
- hCG Estará ↑ en SD (2 MdM)
- Estradiol libre Estará ↓ en SD (0,7 MdM)
- Inhibina A Estará ↑ en SD (2 MdM)

Para el cálculo de la probabilidad, se deben ajustar los datos de MdM obtenidos a otras variables como la edad materna en el momento del parto, el peso o la raza, si tiene hábitos de tabaquismo, o enfermedades como diabetes, o si la gestación fue por reproducción asistida.

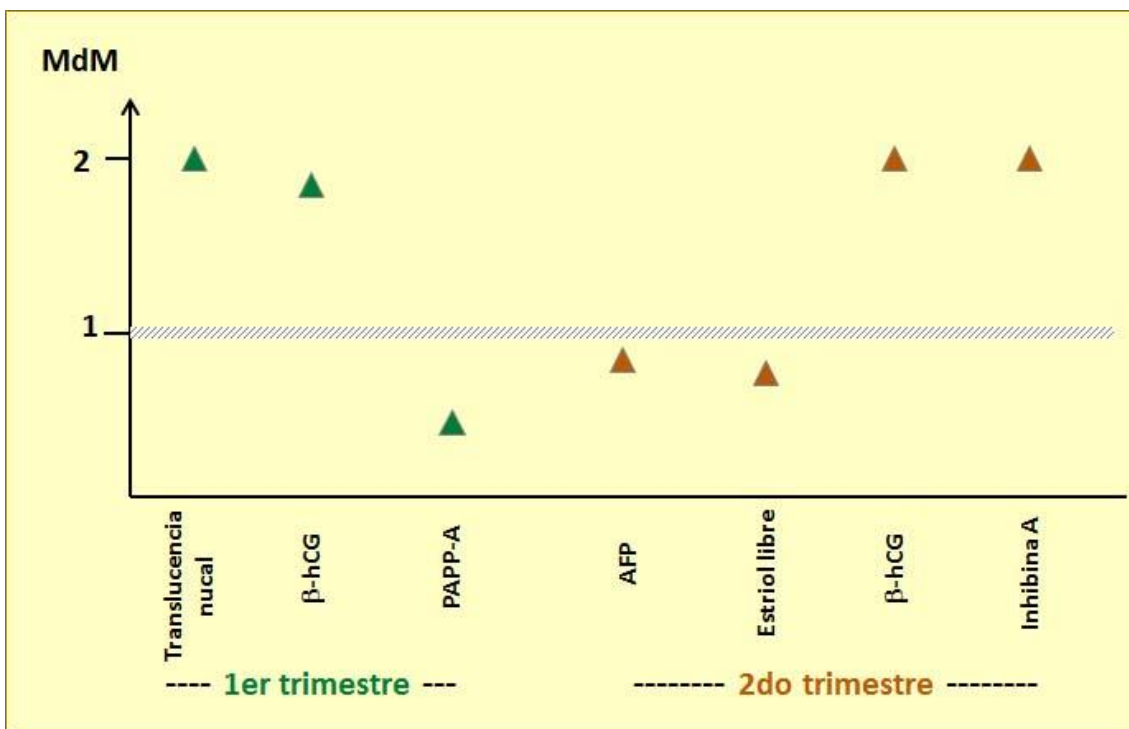


Figura 4.4. Análisis de riesgo de SD en base a evaluaciones bioquímicas y ecográficas, en el 1er o 2do trimestre. MdM, múltiple de la mediana; hCG, gonadotropina corionica; PAPP-A, Proteína asociada a embarazo; AFP, alfa feto proteína. Adaptado de Gonzalez Hernandez, 2014.

Análisis ecográfico o ultrasonido: es una metodología de screening, no invasiva, detecta imágenes indicadoras de la presencia de SD como son engrosamiento de la nuca, acortamiento de huesos largos, espacio entre primer y segundo dedo del pie aumentado, hueso de la nariz, malformaciones de órganos tales como corazón y tubo digestivo, etc. Su valor se basa en la relación existente entre los hallazgos de imágenes encontradas por ultrasonido y la confirmación de la anomalía cromosómica. El resultado de este rastreo es un coeficiente de riesgo cuyo valor será indicativo de la necesidad o no de otras pruebas. El índice de falsos positivos suele ser del 5%. La tasa de detección oscila entre el 70 y 90 %.

El objetivo de las *pruebas de confirmación* es obtener células fetales para detectar la trisomía del cromosoma 21, total o parcial (translocación). La obtención de dichas células se realiza mediante las siguientes técnicas:

Biopsia de vellosidad corial: consiste en obtener tejido placentario por vía vaginal o a través del abdomen, generalmente entre la 8va y 11ma semana de gestación. La punción se realiza bajo seguimiento ecográfico y tiene un riesgo de aborto del 1-2%. Una vez obtenidas las células, se analiza la presencia de un tercer cromosoma 21 mediante:

FISH (fluorescence in situ hybridization) es una técnica que permite identificar rápidamente anomalías cromosómicas mediante la marcación con sondas fluorescentes específicas de un cromosoma en particular. Cuando existe un cromosoma extra como en el SD, se visualizarán tres señales fluorescentes (dos del par normal y otra de la copia extra). Ya que no se requiere células en metafase, no es necesario realizar un cultivo celular, lo cual permite obtener el resultado en 24-48 hs.

Determinación del cariotipo: exige mantener las células en cultivo y detener el ciclo celular en metafase (para la correcta visualización de los cromosomas) y analizar y contar el número de cromosomas. Los resultados se obtienen a las 2-3 semanas. Por otro lado, puede realizarse un cariotipo directo (sin cultivo), que permite detectar el número de cromosomas y las anomalías estructurales más importantes.

Amniocentesis: esta técnica se realiza entre la 14ta y 18va semana de gestación y consigue diagnosticar la mayoría de los fetos con anomalías cromosómicas como el SD. Antes de realizarla, se identifican y localizan la placenta y la cavidad amniótica mediante ecografía y se administra anestesia local. Luego, bajo control ecográfico, se inserta una aguja a través de la pared abdominal y se aspira líquido amniótico. Este procedimiento conlleva un riesgo de aborto del 0,5%. Posteriormente se centrifuga el líquido y las células fetales -que provienen de la descamación fetal- se utilizan para cultivar con el propósito de hacer el cariotipo que detecta el 99,5% de las anomalías cromosómicas o eventualmente se lleva a cabo la técnica de FISH.

Detección de células fetales en la circulación materna

Constantemente se realizan esfuerzos para desarrollar procedimientos de detección y diagnóstico basados en la detección y análisis de eritrocitos nucleados fetales, linfocitos o células trofoblásticas en la circulación materna. La idea es obtener un reemplazo no invasivo para los procedimientos invasivos tales como amniocentesis y la biopsia de vellosidad corial. Sin embargo, todavía se deben superar muchas dificultades técnicas antes del análisis de células fetales.

Indicaciones para realizar un diagnóstico prenatal

Dado que algunas de las técnicas utilizadas en el diagnóstico prenatal proporcionan un riesgo tanto para la madre como para el feto, éstas se indican en casos concretos:

1. Madres con 35 años de edad o mayores.

La incidencia de anomalías cromosómicas aumenta con la edad de la madre. El riesgo de tener una descendencia con una de estas anomalías se duplica aproximadamente cada 2,5 años cuando la edad de la mujer alcanza los 35 años. A esta edad el riesgo de que una mujer embarazada conciba un feto con anomalía cromosómica es aproximadamente de 1 por cada 400 niños nacidos vivos. A esa edad o superior se estima que el riesgo de tener un feto afectado será mayor que los riesgos propios de la amniocentesis. A la edad de 34 años o menos, el riesgo de tener un hijo afectado es generalmente menor que el de abortar como consecuencia de la amniocentesis o de la biopsia.

2. Padres con 50 años de edad o mayores.

Aunque también se ha descubierto un ligero efecto derivado de la edad del padre, es menor que el de la edad materna. Si el padre tiene 50 años o más, el riesgo de tener un hijo con síndrome de Down puede ser un poco superior. Algunos médicos recomiendan practicar análisis prenatales en esta situación.

3. Nacimiento anterior de un hijo con SD o cualquier otra anomalía cromosómica.

Muchos estudios han demostrado que si una pareja tiene un hijo con síndrome de Down u otra anomalía cromosómica, el riesgo de que el hecho se repita es de alrededor del 1%. A causa de este incremento del riesgo, la mayoría de los genetistas y asesores genéticos recomiendan el diagnóstico prenatal a estas familias.

4. Translocación equilibrada de cromosomas en uno de los padres.

Un portador sano de una translocación balanceada tiene una probabilidad del 66% de que sea transferida a su descendencia y un 33% de tener un hijo SD (si el progenitor tiene una translocación 21/21 y el embarazo continúa hasta el final, la probabilidad de que el hijo tenga SD es del 100%).

5. Padres con alteraciones cromosómicas.

Aunque la mayoría de las personas que tienen una anomalía cromosómica de importancia no tendrán probablemente hijos, algunos pueden tenerlos. Por ejemplo, si uno de los padres tiene un síndrome de Down por mosaicismo con porcentaje bajo (es decir, sólo un pequeño porcentaje de sus células tienen un cromosoma 21 extra), tendrá un mayor riesgo de concebir un hijo con SD.

Diagnóstico post-natal

Por otro lado, el diagnóstico post-natal se lleva a cabo mediante las manifestaciones clínicas y por la realización del cariotipo o FISH en linfocitos de sangre periférica. Si el paciente recibe medicación que dificulta el cultivo de linfocitos, se puede hacer FISH a partir de cualquier otro tejido.

Tratamiento

La mejoría en los tratamientos de las enfermedades asociadas al SD ha aumentado la esperanza de vida de estas personas, desde los 14 años hace unas décadas, hasta los 60 años en la actualidad. A lo largo de los últimos 150 años se han postulado diferentes tratamientos empíricos (hormona tiroidea, hormona del crecimiento, ácido glutámico, complejos vitamínicos y minerales, etc) sin que ninguno haya demostrado en estudios longitudinales a doble ciego que su administración provoque ningún efecto positivo en el desarrollo motor, social, intelectual o de expresión verbal de las personas con SD.

Los únicos tratamientos que han demostrado una influencia significativa en el desarrollo de los niños con SD son los programas de Atención Temprana, orientados a la estimulación precoz del sistema nervioso central durante los seis primeros años de vida. Especialmente durante los dos primeros años el SNC presenta un grado de plasticidad muy alto lo que resulta útil para potenciar mecanismos de aprendizaje y de comportamiento adaptativo.

Referencias

- Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 3a edición. Oxford: Oxford University Press, 2004.
- Gonzalez Hernandez, Alvaro. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 2da Edición. Elsevier, 2014.
- Malone FD, Canick JA, Hall RH, et al. First trimester or second –trimester screening, or both, for Down's syndrome. N Eng J Med 2005; 353: 2001-2011. DOI: 10.1056/NEJMoa043693
- McElhinney DB, Straka M, Goldmuntz E, Zackai EH. «Correlation between abnormal cardiac physical examination and echocardiographic finding in neonates with Down syndrome.» Am J Med Genet. 2002 Dec 1; 113 (3): 238-41.
- McKinlay Gardner R.J., Sutherland G.R. Chromosome abnormalities and genetic counseling. Oxford Monographs on Medical Genetics No 29. Oxford University Press 1996.
- Murdoch, J. C., Rodger, J. C., Rao, S. S., Fletcher, C. D., Dunnigan, M. G.: «Down's syndrome: an atheroma-free model?» Br. Med. J. 1977; 2: 226-8.
- Serés A, Cuatrecasas E, Catalá V. Genética, diagnóstico prenatal y consejo genético. En JM Corretger, A serés, J Casaldáliga, K Frías (Eds). Síndrome de Down: Aspectos médicos actuales. Barcelona: Masson, 2005 (p.3-20)
- Scriver, C. R; Beaudet, A. L; Sly, W. S; Valle, D.; Childs, B.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. The Metabolic and Molecular base of inherited disease. Vol. I, Chapter 64. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 8th edition (2001). Chapter 63: Down Syndrome (Trisomy 21)

CAPÍTULO 5

Síndrome de X-Frágil

Sara R. Chuguransky

Introducción

El síndrome de X-frágil es la causa heredable más común de retraso mental y autismo. Es un desorden X-ligado dominante, con penetrancia incompleta. Usualmente, los hombres se ven más severamente afectados que las mujeres. Produce un rango de alteraciones en el desarrollo, incluyendo dificultades en el aprendizaje y discapacidades cognitivas.

La frecuencia general es de 1/4000 varones y 1/8000 mujeres. En nuestro país es de 1/28000 en la población general, siendo de 1/2000 varones y 1/4000 mujeres, aunque estas frecuencias pueden estar subestimadas ya que el 80-90% de los portadores permanecen sin diagnóstico.

Esta patología fue descrita alrededor de 1970 como retraso mental ligado al cromosoma X (XLMR: *X-linked mental retardation*) debido a observaciones previas de la preponderancia de individuos masculinos institucionalizados sobre las mujeres. Hacia 1897, Johnson reportó un aumento del 24% de hombres con retraso mental respecto a las mujeres. Penrose en 1938 identificó la misma tasa de retraso mental entre individuos internados en instituciones psiquiátricas, pero atribuyó esa parcialidad a las mayores expectativas que se tenían en ese momento sobre los hombres y a su mayor agresividad respecto a las mujeres, por lo que era más probable que los institucionalicen. En 1969 Lehrke fue el primero en postular que la gran proporción de hombres con retraso mental se debía a genes codificados en el cromosoma X. Debido a la falta de síntomas clínicos evidentes la contribución de esta patología pasaba inadvertida. En ese mismo año, Lubs reportó un marcador citogenético único en el cromosoma X en cuatro individuos de una familia con XLMR, al igual que en otra familia unos años más tarde. Por estos hallazgos, se llegó a la conclusión de que XLMR no específico asociado al marcador citogenético en el extremo del brazo largo del cromosoma X podía ser una herramienta diagnóstica útil. Su uso como método diagnóstico se vio retrasado debido a que la expresión de este marcador estaba influenciada por las condiciones del cultivo celular. Sutherland, en 1977, demostró que el medio de cultivo celular debía ser deficiente en folatos o timidina para estimular la expresión. Este marcador se conoció como sitio X frágil debido a su apariencia como una brecha o quebradura en el brazo largo del cromosoma X, sitio Xq27.3. Al instaurar este método como diagnóstico, se requiere que al menos 2% de las células expresen el sitio frágil. Al avanzar los estudios de esta patología y con el desarrollo de técnicas moleculares, se pudo establecer que

el gen afectado es el FMR1 (*Fragil X Mental Retardation*) en el cual hay un trinucleotido CGG que se repite en el extremo 5' dentro del extremo 5'UTR del transcrito. Cuando el número de repeticiones excede la normalidad (6-50 repeticiones) se vuelve inestable y dificulta la transcripción y, por ende, la traducción del gen. Este punto se desarrollará en profundidad en la sección Patrones de herencia y Alteración Genética.

Características clínicas

Este síndrome no presenta manifestaciones clínicas evidentes desde el nacimiento, sino que se van presentando con el crecimiento. Se pueden observar patrones de crecimiento inusuales como mayor peso al nacimiento, macrocefalia, altura aumentada o disminuida y apariencia acromegálica en adultos. Las características físicas típicas son:

- Cara alargada (frente y mandíbula inferior prominentes)
- Orejas prominentes
- Macroorquidismo (95% lo manifiestan después de los 15 años)
- Hiperextensibilidad de articulaciones, piel aterciopelada (debido a displasia del tejido conectivo asociada a este síndrome)

Estas características son más evidentes en varones postpuberales. Durante la niñez se puede observar una mayor altura, comienzo temprano de la pubertad y menor altura en la adultez respecto a individuos sanos.

Las personas con Síndrome de X frágil presentan un coeficiente intelectual disminuido, que puede diferir en 20-60 puntos respecto a individuos sin esta patología. Tienen problemas cognitivos, es decir, dificultades en el aprendizaje, en el desarrollo de habilidades aritméticas, en el habla. Ciertos aspectos del comportamiento evidencian conductas autistas como contacto visual pobre, dificultades de interacción social con pares, comunicación verbal y no verbal alterada, movimientos motores estereotipados como el morderse las manos o movimientos de aleteo con los brazos.

Es importante destacar que las alteraciones cognitivas pueden variar desde un retraso mental leve a moderado o severo, dependiendo del grado de mutación que presenten. Dado que es una patología debida a una alteración genética en el cromosoma X es de esperar que los varones sean los más afectados o los que presenten manifestaciones clínicas más evidentes. En las mujeres, debido al fenómeno de inactivación del cromosoma X al azar, los síntomas pueden estar atenuados o ser nulos según la proporción de cromosomas X alterados que hayan sido inactivados.

El gen *FMR1*

El sitio frágil (denominado sitio FRAXA) observado en la banda Xq27.3 entre individuos afectados, además de varios estudios de ligamiento, señalaban la vecindad del sitio X frágil como la localización más probable de la mutación casual. Mediante el uso de distintas sondas Bell et al. y Vincent et al demostraron el estado de metilación anormal de los fragmentos en dicho sitio y así pudieron acotar la localización de la mutación. Además de este sitio frágil existen otros en el genoma:

- Sitios raros: bajo porcentaje de la población los presentan.
- Sitios comunes: mayor parte de la población exhibe estos sitios, afectando al par cromosómico.

No todos los sitios frágiles están asociados a alguna patología o manifestación clínica. En el brazo largo del cromosoma X en cercanía de la banda 27.3 hay otros sitios frágiles: FRAXD, FRAXE, FRAXF (Fig. 5.1). Estos no se relacionan con manifestaciones clínicas del síndrome de X-frágil pero pueden confundir el diagnóstico al realizar técnicas citogenéticas.

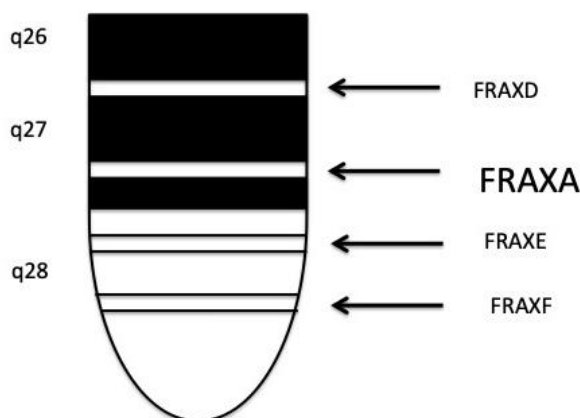


Figura 5.1. Esquema de la región telomérica del cromosoma X y sus sitios frágiles.

Este gen contiene 17 exones y su RNA mensajero (mRNA) tiene 4362 bp incluyendo la larga región no traducida 3' (3'UTR) (Fig. 5.2). Tiene un marco de lectura abierto de 656 aminoácidos. Las repeticiones del trinucleótido CGG responsables de la mayoría de los casos de síndrome del X frágil se encontró en el extremo 5'UTR de los cDNAs. En más del 95% de los casos este síndrome es causado por un tipo de mutación, la expansión inestable del trinucleótido CGG del gen *FMR1*. Se pudieron describir cuatro formas alélicas del gen, con respecto al largo de las repeticiones de CGG halladas en la población: NORMAL, INTERMEDIO o ZONA GRIS, PRE-MUTACION Y MUTACION COMPLETA (Tabla 1). La forma normal contiene usualmente entre 29-31 repeticiones de CGG y contiene entre 1 y 3 interrupciones de un codón AGG, también llamadas puntuaciones, cada 9-10 repeticiones, lo que brinda estabilidad. Es una región altamente polimórfica con variaciones de repeticiones entre 6 y 50.

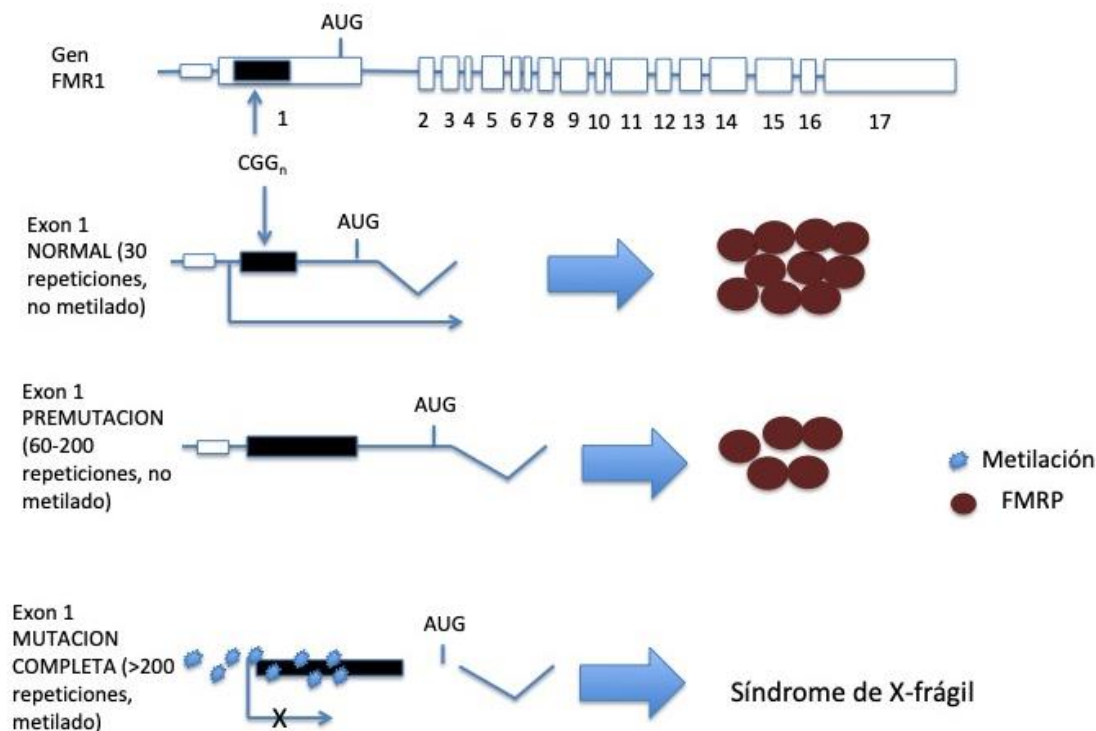


Figura 5.2. Esquema del gen *FMR1* y proteína generada. Adaptada de Santoro et al, 2012.

Tabla 1. Características de los alelos de repeticiones CGG.

Categoría	Número de repeticiones	Estado de metilación	Presencia de mRNA-Proteína	Estabilidad: transmisión	Estabilidad somática	Fenotipo clínico
Normal	6-60	No metilado	+/+	Estable	Estable	Normal
Intermedia	41-60	No metilado	+/+	Estable	Estable	Normal
Premutación	60-200	No metilado	+/+	Inestable	Mayormente estable	Normal
Mutación completa	>200	Metilado	-/-	Inestable	Inestable	Afectado

Normalmente, la región que se repite es estable cuando se transmite de padres a hijos. La pérdida de interrupciones AGG o el aumento en el número de repeticiones CGG hacen que esa región se vuelva inestable y se expanda de tamaño al ser transmitida. Esta forma inestable sería la PREMUTACION y consiste entre 50 y 200 repeticiones. Los portadores de la premutación, tanto hombres como mujeres no presentan síntomas y no se ve afectado el mRNA o la síntesis de la proteína. Se ha visto que las mujeres portadoras de premutación tienen un mayor riesgo de tener descendencia con el síndrome del X frágil ya que alelos con mas de 60 repeticiones se expanden durante la transmisión.

El producto génico del gen *FMR1* es la proteína FMRP1, una proteína de unión a RNA selectiva que actúa como lanzadera entre el núcleo y el citoplasma, transportando mRNAs de varias proteínas y de ella misma. En estado basal es principalmente citoplasmática y está asociada como un complejo

ribonucleoproteico para trasladar polirribosomas o ribosomas asociados a retículo endoplásmico. Es una proteína de unión con preferencia a homopolímeros de RNA como también por ciertos subgrupos de transcritos cerebrales. La proteína codificada por el gen *FMR1* está involucrada en la regulación de la estabilidad del RNA, el transporte subcelular y traducción de mRNAs neurales que codifican para proteínas involucradas en el desarrollo de sinapsis, plasticidad neuronal y desarrollo cerebral (Fig. 5.3). En ausencia de esta proteína, un amplio rango de mRNAs se ven alterados, aumentando la síntesis de proteínas neurales lo que resulta en la dismorfogénesis de las dendritas y un desbalance de excitación-inhibición (Glutamato-GABA) neuronal. Dicha alteración morfológica de las dendritas conducen a conexiones sinápticas débiles derivando en déficits intelectuales y alteraciones de comportamiento que se relacionan también con un sistema de neurotransmisores dañados por falta de esta proteína. Estos fenómenos están presentes en el síndrome del X-frágil, explicando la mayor parte de las manifestaciones clínicas observadas.

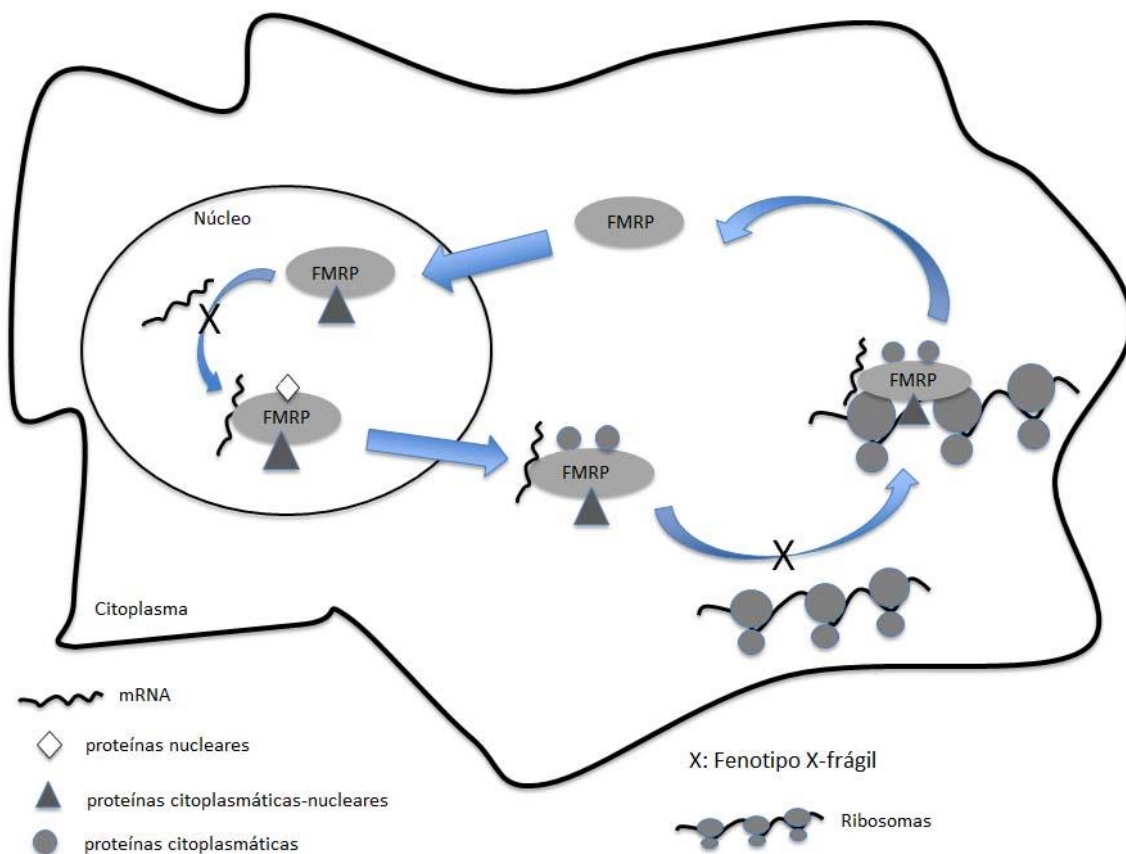


Figura 5.3. Esquema de FMRP y su posible función. Adaptado de Sclerker 2001.

El comportamiento subcelular de FMRP incluyendo su unión selectiva a mRNA, el tráfico núcleo-citoplasma de los mismos y la asociación predominante con polirribosomas citoplasmáticos condujo a la hipótesis de que FMRP puede jugar un rol en exportar desde el núcleo a sus mRNA blanco para luego presentarlos a la maquinaria de traducción. Se ha descubierto que esta proteína se encuentra en espinas dendríticas de neuronas, modulando la localización o traducción de sus mRNAs en la localización subcelular apropiada. Las proteínas importantes para la plasticidad sináptica deben ser

sintetizadas cerca de sus sitios funcionales, por eso resulta crucial el correcto transporte y localización de mRNAs de las proteínas necesarias dentro de las neuronas. En cerebros de pacientes con síndrome de X-frágil, como también en cerebros de ratones knock out para *Fmr1*, se ha visto una formación anormal de espinas dendríticas debido a la falta de FMRP, afirmando la hipótesis de que la síntesis de proteínas es de crucial importancia durante el desarrollo de sinapsis.

En la Figura 5.3 podemos observar que ante la falta de FMRP los mRNAs pueden ser llevados parcialmente al citoplasma por otras ribonucleoproteínas (RNP), constituyendo una vía alternativa cuando falla la formación del complejo ribonucleoproteico con FMRP y daría como resultado el fenotipo de síndrome de X-frágil más frecuente. Se describió otro fenotipo, más severo (I304N) en el cual el defecto está en la asociación del complejo proteínas-mRNA con los ribosomas en el citoplasma, imposibilitando la síntesis total de proteínas.

En fetos de 8-9 semanas de gestación se produce la máxima expresión de *FMR1* en cerebro, cordón espinal, ganglios, retina, cartílago e hígado y en la semana 25 se vio expresión del gen en distintas zonas del cerebro con mayor expresión en el 4to ventrículo, hipocampo y ganglios basales. Esto se relaciona con las manifestaciones clínicas observadas en esta patología, principalmente neurológicas con fuerte relación con el desarrollo y maduración del sistema nervioso central.

En los últimos tiempos se han descrito funciones importantes de FMRP en relación con la regulación de la expresión de otros genes y la generación de sinapsis neuronales.

- Regulación de expresión de otros genes:

Disminuye la expresión de APP (proteína precursora de Amiloide), STEP (proteína tirosina fosfatasa enriquecida en el estriado), proteína Arc y MMP-9 (metaloproteínasa-9)

Aumenta la expresión de GABAR-A (receptores GABA tipo A), GAD (decarboxilasa de ácido glutámico)

- Regulación de sinapsis neuronal:

Participa en la maduración de las espinas dendríticas y en la sinaptogénesis.

Patrones de herencia y alteración genética

Como se mencionó previamente, este síndrome se debe mayormente a una expansión inestable del trinucleótido CGG en el extremo 5' UTR del gen *FMR1*. Las repeticiones del trinucleótido aumentan al pasar de generación en generación, son mutaciones dinámicas. Las mutaciones completas derivan de premutaciones, por lo tanto, cuando el número de repeticiones excede las 200, el gen se silencia debido a la hipermetilación de C y Gs. Antes de que se de este escenario, algo de proteína puede producirse y los síntomas son nulos o muy escasos, dependerá del nivel de proteínas que pueda generar ese individuo. El evento mediante el cual el mayor número de repeticiones CGG que se producen de generación en generación se relaciona con las manifestaciones clínicas observadas se denomina FENOMENO DE ANTICIPACION, debido a que generaciones más jóvenes, con mayor número de repeticiones presentan manifestaciones clínicas más severas.

A la hora de evaluar la transmisión de la mutación se debe tener en cuenta el sexo y fenotipo del progenitor que la porta, y esto se debe a que se ha observado que la probabilidad de expansión de las repeticiones en el cromosoma X del varón son muy bajas:

- hijas de varones portadores de premutación que no tienen manifestaciones clínicas, raramente serían afectadas mentalmente, mientras que hijas de mujeres que no expresan el síndrome tienen un 30% de posibilidades de tener hijas con este síndrome.
- Mujeres portadoras afectadas cognitivamente tienen mayor riesgo de tener hijos con esta patología.

De esta manera, mujeres portadoras tienen 50% de probabilidades de transmitir el gen *FMR1* inestable a su descendencia; según el número de repeticiones el riesgo de expansión de premutación a mutación completa es mayor. En cambio, en los varones se observó que la región repetida no se modifica dramáticamente cuando se lo transmite a sus hijas, de hecho, el tamaño de las repeticiones puede incluso disminuir. El riesgo de expansión a mutación completa es muy bajo.

Entonces surge la pregunta: ¿Cuándo ocurren las expansiones de los trinucleótidos CGG? Hay 2 periodos de tiempo para las expansiones: la meiosis y el periodo embrionario temprano. Las expansiones deben ocurrir en células germinales, que están en división premeiótica o meiótica. En caso que ocurra una expansión de premutación a mutación completa en un varón, ésta se pierde durante la espermatogénesis, una de las teorías que lo explican es que hay una selección entre los espermatozoides generados en la cual los que contienen la mutación completa serían más lentos y defectuosos por lo que no alcanzarían a fecundar un óvulo. Como puede intuirse, los hombres con mutación completa no se reproducen, son estériles. Hombres con premutación se la transmiten a sus hijas pero el número de repeticiones es estable. Las mujeres con premutación pueden expandirla según la edad, el número de repeticiones y de AGG que presenten. Por lo tanto, queda claro que los hombres transmiten la premutación a sus hijas y la probabilidad de expansión del número de repeticiones es baja. En cambio, en el caso de las mujeres, la probabilidad de expansión es mucho mayor, con altas chances de convertir una premutación a mutación completa al momento de la transmisión a su descendencia. En la Tabla 2 se puede ver cómo varía la probabilidad de expansión del trinucleótido según el número de repeticiones de la portadora.

Tabla 2. Número de repeticiones CGG en la mujer portadora vs. Probabilidad de expansión

Número de repeticiones	Probabilidad de expansión
< 70	10%
70-90	50-70%
> 90	90%

Mecanismos de expansión

El mecanismo por el que se produce la expansión de repeticiones de trinucleótidos no se conoce con exactitud. Se han reportado dos eventos de conversión génica en *FMR1*, aunque se necesitan mayores estudios para confirmarlo. Una de las teorías más fuertes se centra en el deslizamiento del ADN durante la replicación, debido a los pequeños aumentos del número de repeticiones en los alelos intermedios o zona gris o en los alelos en rango de premutación más pequeños. Esos incrementos son de 10 o menos repeticiones y se observaron en otras patologías que involucran mutaciones dinámicas. Los cambios parecen ser polares, ocurriendo en el extremo 3' de las repeticiones. El largo de las repeticiones en este extremo es clave para determinar la estabilidad. Así, se ha observado que alelos con 24 o más repeticiones CGG están predispuestos a inestabilidad dando lugar, en última instancia, a premutaciones varias generaciones después por incrementos pequeños de repeticiones.

Un mecanismo que puede conducir a esa variación polar es la fidelidad diferencial entre las hebras conductora y rezagada en la replicación. Se cree que si el deslizamiento de la hebra de ADN ocurre dentro del complejo de replicación, la polimerasa en la hebra rezagada elonga los intermediarios deslizados con una frecuencia 20 veces mayor que la polimerasa de la hebra conductora. A modo de modelo, sugiere que la tasa de mutación que conduce a variaciones por replicación asimétrica está relacionada directamente con el largo de repeticiones. Como consecuencia, la tasa de mutación se vuelve relativamente alta en el largo de premutación de 150 a 600 nucleótidos (50-200 repeticiones). Esas longitudes exceden la longitud normal de los fragmentos de Okazaki en mamíferos, que son de 25 a 300 nucleótidos. Si esos fragmentos están compuestos completamente por repeticiones de trinucleótidos y no tienen el marco de referencia, son más proclives a deslizamiento. Otro modelo que se tiene en cuenta para explicar el mecanismo de expansión es la formación de estructuras secundarias intramoleculares por las repeticiones de trinucleótidos, que pueden ser resistentes a la acción de endonucleasas durante la replicación. Esto requiere que sea resuelto por recombinación o un mecanismo de cierre que pueden conducir a expansiones de las repeticiones de CGG.

Diagnóstico

El Colegio Americano de Genética Médica hizo algunas recomendaciones sobre en qué casos se debe considerar el diagnóstico de Síndrome de X-frágil y como proceder. Los individuos en los que se debe considerar el testeo son:

- Individuos de cualquier sexo con retraso mental, retraso en el desarrollo o autismo especialmente si tienen características físicas o de comportamiento del síndrome de X-frágil, historia familiar de síndrome de X-frágil o si tienen familiares con retraso mental no diagnosticado.
- Individuos en busca de consejo reproductivo que poseen historia familiar de síndrome de X-frágil o historia familiar de retraso mental no diagnosticado.

- Fetos de madres portadoras de la mutación.
- Pacientes que tienen un resultado citogenético de X-frágil que es discordante con su fenotipo. Incluye pacientes que tienen una fuerte indicación clínica (incluso riesgo de ser portador) y que han tenido un resultado ambiguo o negativo, y pacientes con fenotipo atípico que tuvieron un test positivo.

El análisis de ADN es el de elección si se está investigando específicamente para síndrome de X-frágil asociado a expansión del trinucleótido en el gen *FMR1*. Si no se conoce o sospecha la etiología del retraso mental, el estudio de ADN para síndrome de X-frágil se llevará a cabo como parte de una evaluación genética, que incluye análisis citogenético de rutina. Los estudios citogenéticos son críticos ya que las anomalías cromosómicas son más frecuentes que mutaciones de X-frágil. En individuos donde ya se estableció una historia familiar de este síndrome, el análisis de ADN sería suficiente. El estudio prenatal de un feto es indicado luego de tener un test positivo de una madre portadora. Cuando se conoce esta condición en la madre, se puede ofrecer un estudio prenatal para determinar si el feto heredó el gen normal o el mutado pero estos resultados deben ser interpretados con precaución ya que el estado de metilación del gen a menudo no puede establecerse en vellosidades coriónicas al momento de la toma de muestra. Si bien la técnica estándar para diagnóstico prenatal es el estudio de vellosidades coriónicas, en esos casos deberían seguir con amniocentesis para resolver un resultado ambiguo.

Inicialmente se utilizaba el test citogenético ante sospecha de esta patología. Es una técnica muy laboriosa, que requiere gran entrenamiento por parte del operador y es costosa. En principio se deben cultivar las células en un medio deficiente de folato para que se exprese el sitio frágil, las células deben estar en metafase para poder visualizar los cromosomas y se deben analizar entre 100-150 células. Al menos el 2% de las células estudiadas deben tener el sitio frágil. El inconveniente con esta técnica es que puede haber falsos positivos por presencia de otros sitios frágiles cercanos, como se mencionó anteriormente y que no son patológicos. No es sensible para detectar la mutación en mujeres heterocigotas no expresivas o varones con premutación, como tampoco posibilita el diagnóstico prenatal. Tampoco permite hacer estudios poblacionales a gran escala debido al tiempo y costo que implicaría.

Los avances en biología molecular permitieron disponer de técnicas más sencillas, reproducibles y accesibles para poder hacer el diagnóstico del síndrome de X-frágil. Estas incluyen análisis de ADN buscando la expansión del trinucleótido mediante PCR y Southern blot. Esta última técnica se diseñó para estudiar solo la longitud de las repeticiones o las longitudes de las repeticiones como también el estado de metilación en sitios de restricción claves del gen *FMR1*. La enzima de restricción más ampliamente utilizada en Southern blot es *EcoRI*. La digestión de ADN genómico normal con esta enzima libera un fragmento de 5.2kb que incluye la región del promotor de *FMR1* y el primer exón conteniendo las repeticiones CGG. Una banda de mayor tamaño en premutación y mutación completa en varones reemplaza esa banda de 5.2kb, aunque premutaciones más pequeñas pueden no ser discernidas tan fácilmente. Alelos con la mutación completa exhiben una banda difusa o ancha, reflejando el largo del mosaicismo de la repetición en células somáticas. Posteriormente se incluyó la enzima *HindIII* que mostró ser superior a *EcoRI*

porque corriente abajo del sitio de *EcoRI* es refractario a digestión, conduciendo a una banda parcialmente digerida de 6.4kb que puede ser confundida con una mutación completa o puede generar ruido por bandas sombras. En la práctica, la digestión con *EcoRI* o *HindIII* se lleva a cabo junto con una segunda enzima de restricción, sensible a metilación como *EagI* o *BssHII*. Así, si el fragmento de *EcoRI* de 5.2kb no está metilado se cliva en 2 fragmentos, uno de 2.4kb y otro de 2.8kb, ese último fragmento contiene las repeticiones de CGG (Fig. 5.4).

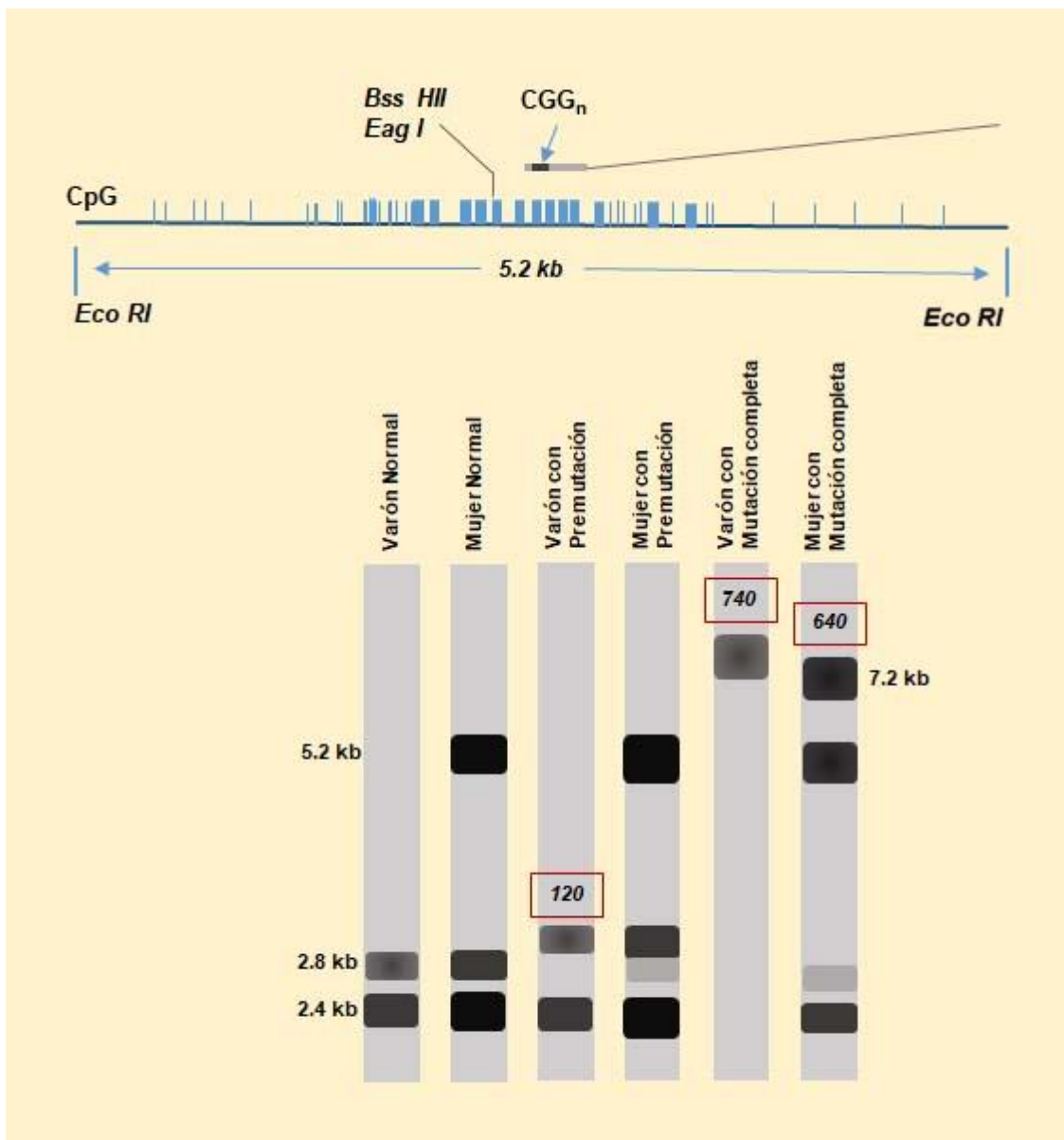


Figura 5.4. Esquema de un Southern blot obtenido de la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BssHII* o *EagI* (sensibles a metilación), mostrando los alelos normales, con la premutación o con la mutación completa para cada sexo. En la parte superior se muestra el primer exón del FMR1 que contiene los repetidos CGG con los dibucleotidos CpG. Adaptado de Scriber, 2001.

En la Figura 5.4 podemos apreciar un ejemplo de los tamaños de bandas de Southern blot obtenidos por digestión conjunta de las enzimas de restricción. En el caso de los varones la interpretación de los resultados es más sencilla, en cambio, en las mujeres puede complicarse

debido a que el cromosoma X inactivo estará metilado y puede confundirse con la metilación debido a la mutación genética en este síndrome.

Tratamiento

El síndrome de X-frágil no tiene un tratamiento específico. Hay intervenciones efectivas que tratan los síntomas del síndrome, desde una perspectiva multiprofesional. Es esencial maximizar la visión y el oído para asegurar que cada paciente pueda alcanzar su potencial. En caso de condiciones menos frecuentes como crisis epilépticas, prolapso de válvula mitral o problemas ortopédicos, serán atendidos por especialistas. Casi todos los niños con síndrome de X-frágil se beneficiaron enormemente con terapia de lenguaje y habla como también con terapia ocupacional o de integración sensorial. Estas terapias aportan beneficios secundarios relacionados al comportamiento, ya que minimizan los berrinches o ataques de agresividad que puedan experimentar. Con respecto al aprendizaje, se puede abordar desde distintos programas especiales de educación.

Mediante farmacoterapia se pueden mejorar dificultades de comportamiento que a veces interfieren en el aprendizaje y sociabilización. Se ha utilizado medicación estimulante para tratar hiperactividad significativa y desorden de hiperactividad y déficit de atención en algunos niños con síndrome de X-frágil. Otros síntomas tratados con éxito incluyen ansiedad, agresión y alteraciones del humor.

Referencias

- Pugin A, Faundes V, Santa María L, Curotto B, Aliaga S, Salas I, Soto P, Bravo P, Peña MI, Alliende MA. Aspectos clínicos, moleculares y farmacológicos en los trastornos asociados a gen 1 del retraso mental del Xfrágil. *Neurología*. 2017 May;32(4):241-252.
- Santoro MR, Bray SM, and Warren ST. Molecular Mechanisms of Fragile X Syndrome: A Twenty-Year Perspective. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2012. 7:219–45.
- Schmitt, L.; Shaffer, R.; Hessel, D.; Ericksson, C. Executive Function in Fragile X Syndrome: A Systematic Review. *Brain Sciences*, 2019, 9(1), 15.
- Scriver, C. R; Beaudet, A. L; Sly, W. S; Valle, D.; Childs, B.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. *The Metabolic and Molecular base of inherited disease*. Vol. I, Chapter 64. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 8th edition (2001).
- Síndrome de X frágil Argentina, página web: <http://www.sindromexfragil.com.ar/>
- Weber DJ, Smith E, Berry-Kravis E, Cadavid D, Hessel D, Ericksson C. Voice of People with Fragile X Syndrome and Their Families: Reports from a Survey on Treatment Priorities. *Brain Sciences*, 2019, 9(2),18.

PARTE III

Alteraciones del metabolismo de carbohidratos

CAPÍTULO 6

Diabetes mellitus

Ana M. Cortizo y Antonio D. McCarthy

Introducción

La Diabetes mellitus (DM) constituye un problema de salud pública global creciente, como lo han planteado la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la Federación Internacional de Diabetes (IDF) y la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2014 más de 400 millones de personas (8,5% de la población mundial) padecía esta enfermedad, y su prevalencia aumenta con mayor rapidez en países de mediano y bajos recursos. La Diabetes es una importante causa de ceguera, insuficiencia renal, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y amputación de los miembros inferiores. Se estima que en 2015 la Diabetes fue la causa directa de 1,6 millones de muertes. Según proyecciones de la OMS, la Diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030. Dado que la Diabetes lleva a importantes pérdidas económicas para las personas que las padecen, sus familiares y al sistema de atención de la salud, es importante adoptar políticas de prevención y atención de estos pacientes.

La DM es una enfermedad crónica grave, caracterizada por hiperglucemia, que se desencadena cuando el páncreas no puede producir suficiente insulina o cuando el organismo no puede usar la insulina en forma eficiente. Como consecuencia de la hiperglucemia sostenida, se producen daños en diferentes órganos y tejidos que pueden terminar con la muerte del paciente. Estas complicaciones crónicas incluyen: infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, amputación de miembros inferiores, pérdida de visión y daños neurológicos.

Regulación de la glucemia

La homeostasis de la glucosa es un proceso fundamental en el que los niveles de glucosa circulante se mantienen en un intervalo muy estrecho (90-110 mg/dl) y muy bien regulado. Los niveles de glucosa son controlados principalmente por la insulina que estimula el transporte y consumo de glucosa por diferentes órganos, y por el glucagón que estimula la degradación de glucógeno y la gluconeogénesis.

Cuando los niveles de glucosa descienden se desencadenan una serie de mecanismos que protegen de la hipoglucemia, a través de la liberación de hormonas contra-regulatorias (glucagón y adrenalina, principalmente). Luego de un ayuno, los principales órganos productores de glucosa son el hígado y los riñones, los que contienen la enzima glucosa-6-fosfatasa para liberar la glucosa a circulación (Figura 6.1). Aproximadamente el 80 % de esta glucosa proviene del hígado.

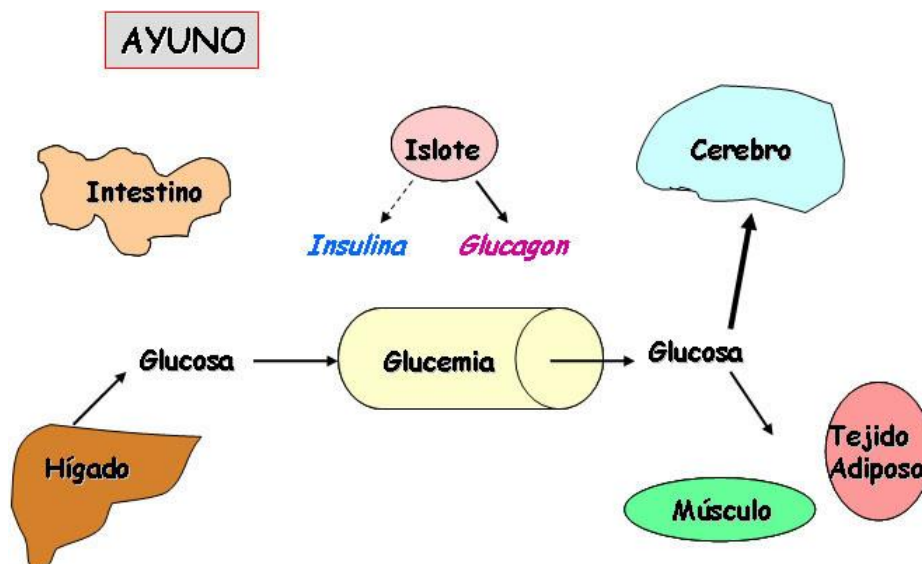


Figura 6.1. Homeostasis de la glucosa en el estado de ayuno.

En un estado pos-absortivo, la glucosa que ingresa al organismo a través de la absorción intestinal se distribuye en diferentes tejidos según sus demandas (Fig. 6.2). El aumento en la glucosa plasmática desencadena la secreción de insulina, la cual estimula el transporte y utilización de glucosa en los tejidos dependientes de insulina (músculo y tejido adiposo) a la vez que bloquea la producción de glucosa hepática endógena.

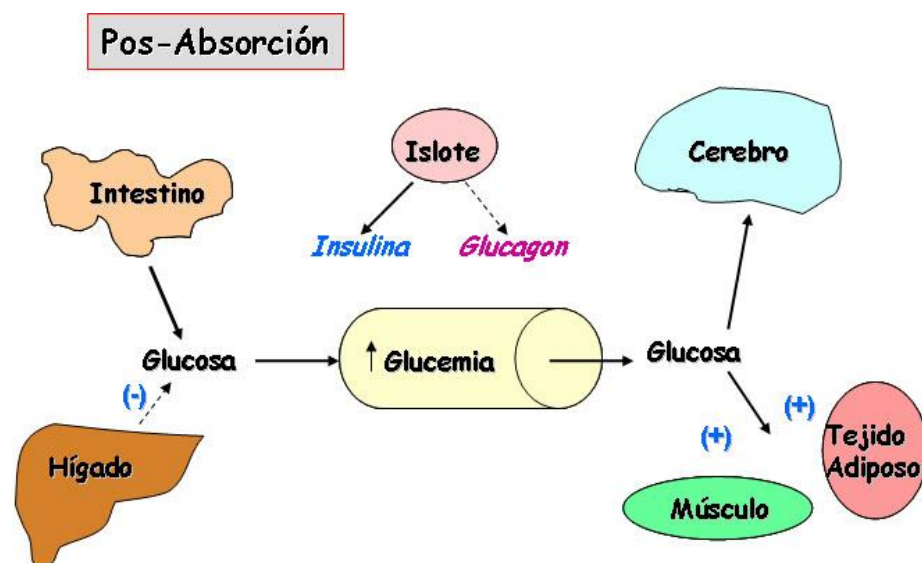


Figura 6.2. Homeostasis de la glucosa en el estado pos-absortivo. La insulina inhibe (-) la salida de glucosa hepática y estimula (+) la captación por los tejidos periféricos.

Cuando los mecanismos de regulación de la glucemia fallan, se puede desencadenar un cuadro de Diabetes. Para entender esta patología, vamos a resumir aspectos de la producción y acción de las hormonas regulatorias, insulina y glucagón.

Insulina y Glucagón: Producción y mecanismos de acción

Los islotes de Langerhans son micro-órganos endócrinos que representan en conjunto aproximadamente el 1% en peso del páncreas. Están compuestos por una población heterogénea de células, entre ellas las células B o beta que sintetizan y secretan insulina en el centro del islote (aproximadamente el 60-65%) y las células A o alfa que sintetizan y secretan glucagón, distribuidas en la periferia del islote. Las hormonas se almacenan en gránulos de secreción, con un centro electron-denso y un halo claro periférico (Fig. 6.3).

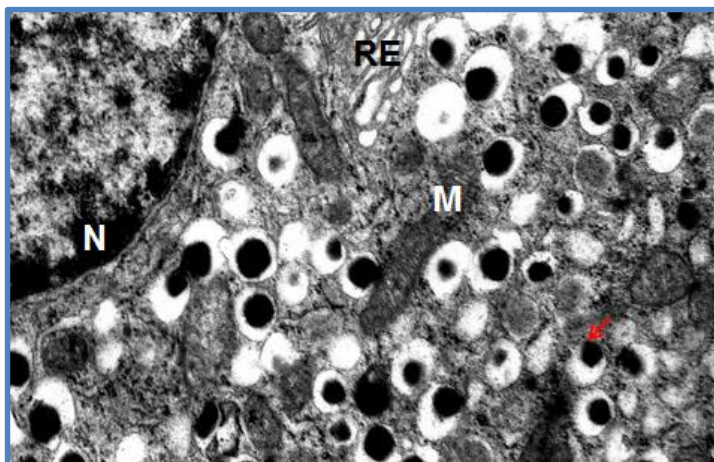


Figura 6.3. Micrografía electrónica de una porción de célula B pancreática. N, núcleo; RE, retículo endoplasmático; M, mitocondria. Flecha roja, gránulo de insulina con un centro electron-denso y una membrana envolvente separada por un halo claro.

Frente a un aumento en la glucosa plasmática, la célula B responde aumentando la secreción de insulina. Esta respuesta tiene varias características, por ej. es sigmoidal, con un umbral a concentraciones de 3.3 mM (72-90 mg/dL), seguido de una respuesta lineal (entre 4-16 mM) con un máximo alrededor de 20mM (360mg/dL), según estudios con islotes aislados. Otra característica es que la respuesta es bifásica; es decir, cuando los niveles de glucosa se elevan de 90 a 180mg/dL se observa un primer pico de secreción rápido, seguido de un período de latencia o refractario después del cual hay una respuesta más lenta y sostenida en la secreción de insulina. Por otro lado, cuando los niveles plasmáticos de glucosa caen por debajo de 70 mg/dL, se dispara la secreción de glucagón desde las células A del islote.

En las células B, la glucosa internalizada a través del transportador GLUT-2 es rápidamente fosforilada a través de la enzima glucoquinasa. Esto desencadena una cascada de señales y mediadores intracelulares que van a estimular la secreción de insulina, entre ellos el AMP cíclico, los

fosfoinosítidos y el calcio (Figura 6.4). Como consecuencia del metabolismo de glucosa, aumentan los niveles de ATP, se induce una despolarización de la membrana plasmática con salida de K, lo cual abre un canal de Ca dependiente del voltaje e ingresa Ca desde el exterior. Por otro lado, el Ca almacenado en organelos se libera y aumenta así el Ca intracelular. Esto, junto con otros mecanismos mediados por PKC, IP₃ y PKA, induce el movimiento de los gránulos B que se funden con la membrana plasmática y liberan su contenido por exocitosis al espacio extracelular.

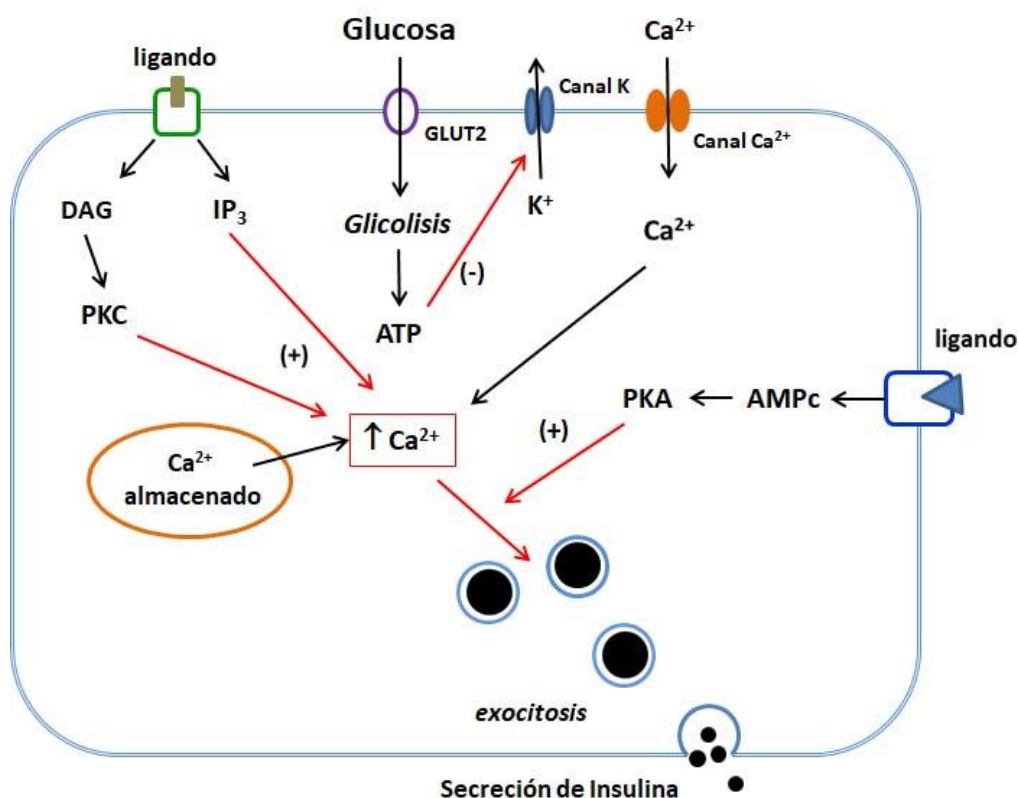


Figura 5.4. Mecanismo de Secreción de Insulina en la célula B pancreática.

El gen de glucagón se expresa en el páncreas y el intestino, siendo procesado en forma diferente en ambos tejidos. En las células A del páncreas el proglucagón es transformado por la prohormona convertasa2 para liberar los péptidos glucagón, GRPP y el llamado “fragmento mayor de proglucagón”. A nivel local el glucagón ejerce una acción insulínica sobre las células B del páncreas, estimulando de la secreción de insulina a través de su unión a Receptores de superficie que aumentan el AMPc intracelular. Por otro lado, la secreción de glucagón es multifactorial: depende de varios nutrientes, así como de una regulación paracrina por la insulina, la somatostatina y otros reguladores neuroendocrinos.

En cuanto a las acciones de insulina y glucagón, ambas hormonas juegan un rol clave en la homeostasis de fuentes de carbono y energía. Luego de una comida, la insulina estimula la captación y el almacenamiento de carbohidratos (en forma de glucógeno), lípidos (acumulación de triglicéridos) y aminoácidos (aumentando la síntesis de proteínas, el crecimiento y diferenciación celular); al mismo tiempo que antagoniza el catabolismo de las reservas (disminuye la salida de

glucosa desde el hígado inhibiendo la glucogenólisis y gluconeogénesis). Durante el ayuno, la caída en la insulina circulante junto con el aumento en los niveles de hormonas contra-regulatorias, induce la degradación de los combustibles almacenados y aumentan los sustratos para el metabolismo celular.

La insulina, a través de la unión a su receptor, induce la autofosforilación del mismo y desencadena una serie de mecanismos de transducción de señales que son redundantes e interactúan unos con otros para producir los efectos celulares antes mencionados (Fig. 6.5).

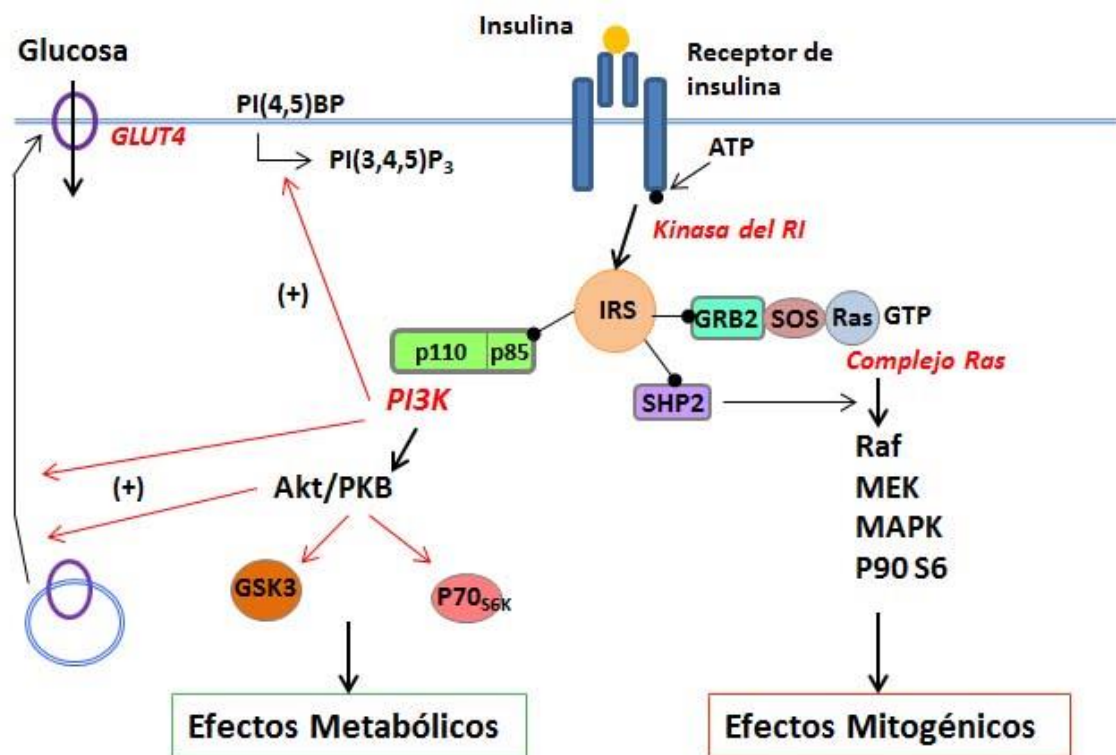


Figura 6.5. Vías de transducción de señales en la acción de la Insulina.

Al mismo tiempo, la unión de la Insulina a su receptor induce la internalización del complejo a través de un mecanismo de endocitosis mediada por receptores. Estos complejos Insulina-Receptor se encuentran ubicados en microdominios cubiertos con clatrina. Una vez internalizados se unen a lisosomas donde el entorno ácido libera la insulina, y pueden ser degradados o reciclados como vesículas con el receptor libre por mecanismos de exocitosis. Si los niveles de insulina circulante se mantienen elevados en forma crónica, se produce la desensibilización celular para la acción de insulina, en un mecanismo que se denomina “*down regulation*”.

El glucagón se une a un receptor específico, expresado principalmente en el hígado, que se acopla a una adenilato ciclasa (AC) a través de una proteína G estimulante (Gs). Como consecuencia aumentan los niveles de AMPc y se estimula la proteína kinasa dependiente (PKA), activando la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la salida de glucosa a circulación.

Insulina y Glucagón: Acciones Fisiológicas

Utilización de glucosa en Músculo esquelético y Tejido Adiposo. En ambos tejidos la glucosa ingresa a las células a través de un transportador (GLUT4) que es activado por la insulina. Esta etapa constituye el paso de velocidad limitante para el consumo de glucosa en estos tejidos. Posteriormente a su internalización, la glucosa es fosforilada por la acción de una hexoquinasa a G-6-P y metabolizada a través de la vía glicolítica a piruvato, el cual ingresa a la mitocondria para ser oxidado vía piruvato deshidrogenasa (PDH) a Acetil CoA y finalmente a CO₂ a través del ciclo de Krebs (en el músculo) o usado para la síntesis de lípidos (en tejido adiposo) (Fig. 6.6).

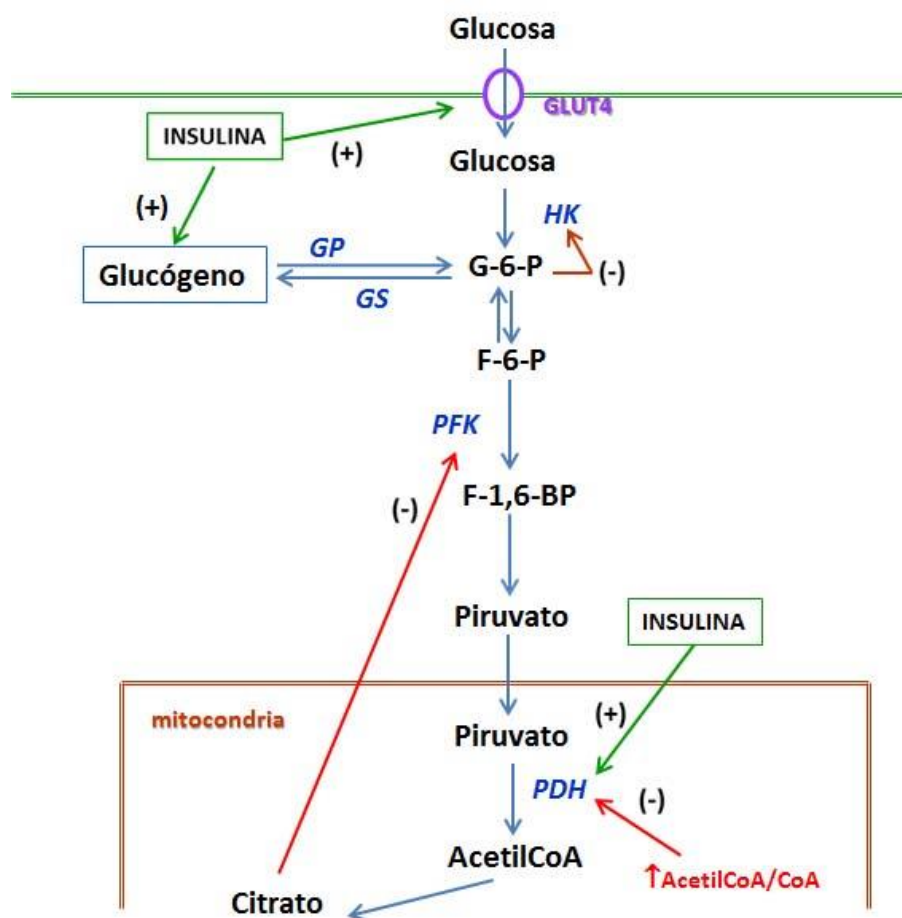


Figura 6.6. Efectos de la Insulina sobre el metabolismo de glucosa en músculo y tejido adiposo. GLUT4, transportador de glucosa tipo 4; HK, hexoquinasa; GP, glucógeno fosforilasa; GS, glucógeno sintasa; PFK, fosfofructoquinasa; PDH, piruvato deshidrogenasa

La PDH es una enzima clave estimulada por la insulina (en adipocitos) e inhibida cuando aumenta la relación AcetilCoA/CoA como consecuencia del metabolismo de lípidos. Esto constituye las bases del Ciclo de glucosa/Ácidos grasos originalmente descrito por Randle, en el cual altos niveles circulantes de Ácidos Grasos, movilizados desde el tejido adiposo, son tomados por el músculo y metabolizados (Fig.6.7). El aumento en la relación acetil CoA/CoA en el músculo inhibe el metabolismo de glucosa vía inhibición directa de PDH y la inhibición indirecta de fosfofructo-1-kinasa (PF1K) y Hexoquinasa por aumento de citrato y G-6-P respectivamente (Fig. 6.6).

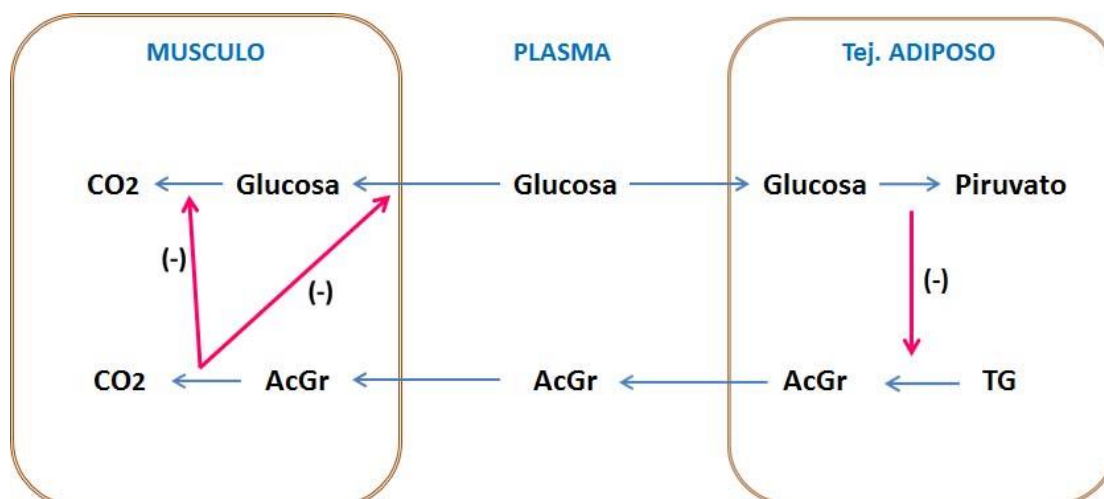


Figura 6.7. Ciclo de Glucosa / Ácidos Grasos. Adaptado de Espinal 1989.

Por otro lado, la glucosa puede almacenarse en forma de glucógeno en el músculo. La regulación de este proceso ocurre por mecanismos de fosforilación/defosforilación bien conocidos, a través de vías separadas que llevan a la síntesis de glucógeno, por acción de Glucógeno sintasa (estimulada por la insulina) o a la degradación, vía la glucógeno fosforilasa (estimulada por glucagón).

Utilización de Glucosa en el hígado. El hígado tiene la capacidad de consumir glucosa y además de producirla (glucogenolisis y gluconeogénesis) para la utilización en tejidos extra-hepáticos. Después de un ayuno de 8h, ambos procesos contribuyen igualmente a la producción de glucosa hepática. Si el ayuno se prolonga, el glucógeno almacenado decae y la glucosa es producida casi exclusivamente por gluconeogénesis a partir de precursores no carbohidratos (glicerol, lactato, piruvato y aminoácidos).

La glucosa ingresa al hígado vía el GLUT2 (igual que en la célula B pancreática), equilibrando rápidamente los niveles de glucosa intracelular con los plasmáticos. La glucosa es fosforilada rápidamente por acción de la glucoquinasa (GK), de alta Km, lo cual constituye el paso limitante de velocidad en este tejido y sigue la vía glicolítica. La regulación de la utilización de glucosa ocurre por medio del activador alosterico F-2,6-BP, sintetizado y degradado por acción de la enzima bi-funcional Fosfo-fructo 2 kinasa (PF-2K) / Fructosa 2,6 bifosfatasa (F-2,6-BPasa). A su vez F-2,6-BP inhibe la F-1,6-BPasa y estimula PF-1K, aumentando la vía glicolítica. Glucagon aumenta el AMPc y consiguiente activación de la PK-A dependiente de AMPc, estimulando la fosforilación de Piruvato kinasa (PK) y PF-2K, inhibiendo sus acciones. Reduce el flujo glicolítico y estimula tanto la gluconeogénesis como la salida de glucosa hepática mediada por glucosa-6-fosfatasa (Fig. 6.8). La insulina antagoniza los efectos del glucagón disminuyendo los niveles de AMPc una vez que han sido inducidos por glucagón.

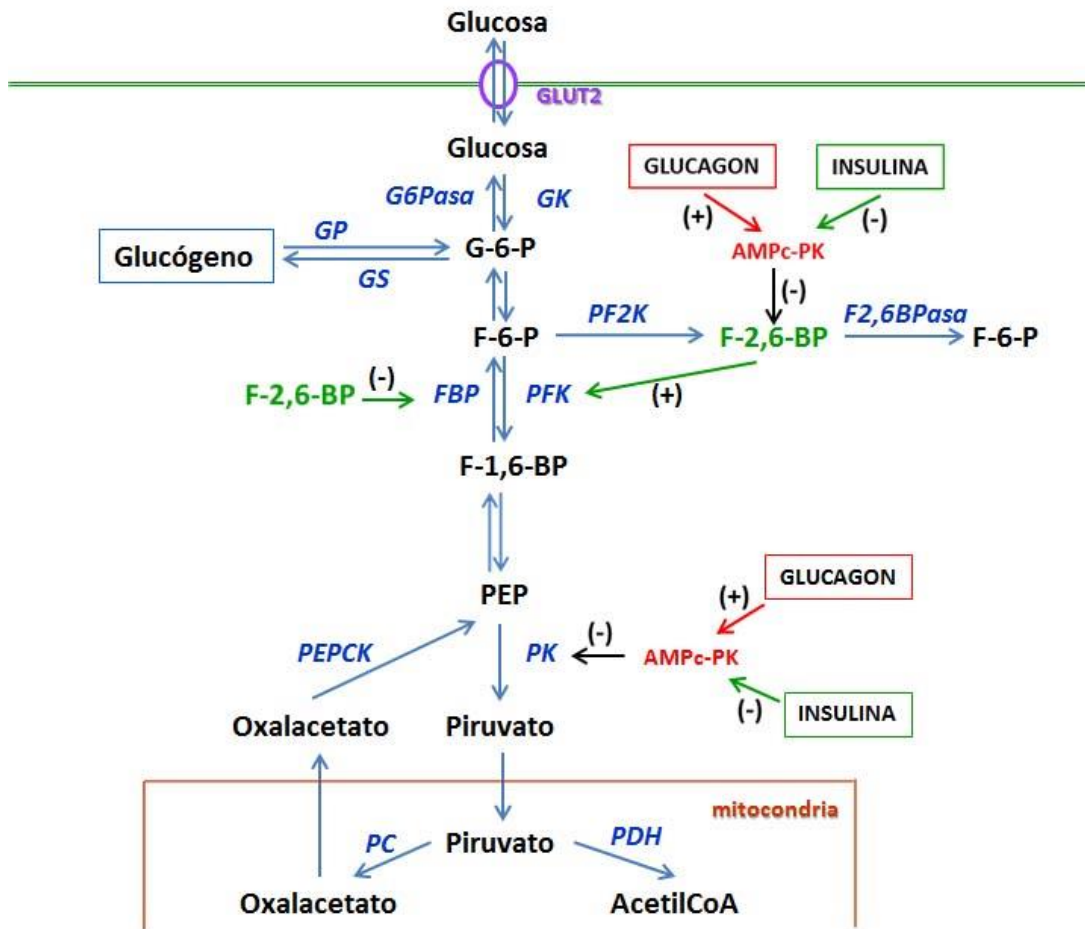


Figura 6.8. Metabolismo de glucosa en el hígado y su regulación por Insulina y Glucagón. Glut2, transportador de glucosa; GK, glucoquinasa; G6Pasa, glucosa 6 fosfatasa; GP, glucógeno fosfatasa; GS, glucógeno sintasa; PF2K, fosfofructo 2 quinasa; F2,6BPasa, fructosa 2,6 bifosfatasa; PFK, fosfofructo quinasa; FBP, fructosa bifosfatasa; PK Piruvato quinasa; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxi quinasa; PDH, piruvato deshidrogenasa; PC, piruvato carboxilasa. Adaptado de Espinal, 1989.

Por otro lado, el piruvato que entra a la mitocondria es convertido a oxalato por acción de piruvato carboxilasa (PC); el oxalato vuelve al citosol y puede ser convertido a fosfoenolpiruvato (PEP) por acción de PEP carboxiquinasa (PEPCK).

Varias enzimas gluconeogénicas son reguladas a nivel transcripcional por hormonas, a través de factores de transcripción que interaccionan con los promotores de sus genes. El aumento de AMPc via PKA nuclear, fosforila el factor de transcripción CREB y estabiliza el complejo CRE. Esto induce la expresión de enzimas gluconeogénicas (PEPCK, F1,6BPasa, G6Pasa y PC). La insulina antagoniza estos efectos, estimulando la fosforilación de otros factores de transcripción como CRCT2 and FOXO1, los que así son excluidos del núcleo y se bloquea la expresión de enzimas gluconeogénicas.

Efectos sobre el metabolismo de lípidos. Tanto en el hígado como en el tejido adiposo, la insulina ejerce efectos anabólicos sobre los lípidos. Aumenta la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos, mientras que el glucagón inhibe la lipogénesis en el hígado (al igual que lo que ocurre por efecto de adrenalina en el tejido adiposo) a través de una estimulación de la vía AMPc/PKA.

Los mecanismos mediante los cuales la insulina ejerce estos efectos incluyen una activación de PDH y de AcetilCoA carboxilasa (AcetilCoACx) (Fig 6.9). Esta última enzima convierte el AcetilCoA

en Malonil CoA. La insulina activa AcetilCoACx promoviendo su polimerización a una forma activa, mientras que el aumento en AMPc/PKA (por acción de glucagon o adrenalina) induce su fosforilación a una forma inactiva. Como consecuencia del aumento en los niveles de malonil CoA se estimula la síntesis de Ácidos grasos. Por otro lado la insulina estimula la esterificación de ácidos grasos para formar triglicéridos (TG), a través de la enzima *glicerol-P-acil transferasa* (GPAT). A su vez, la hidrólisis de los TG es estimulada por glucagón o adrenalina, a través de la activación de la TGlipasa o lipasa sensible a hormonas, vía cambios en los niveles de AMPc, estimulando así la lipólisis.

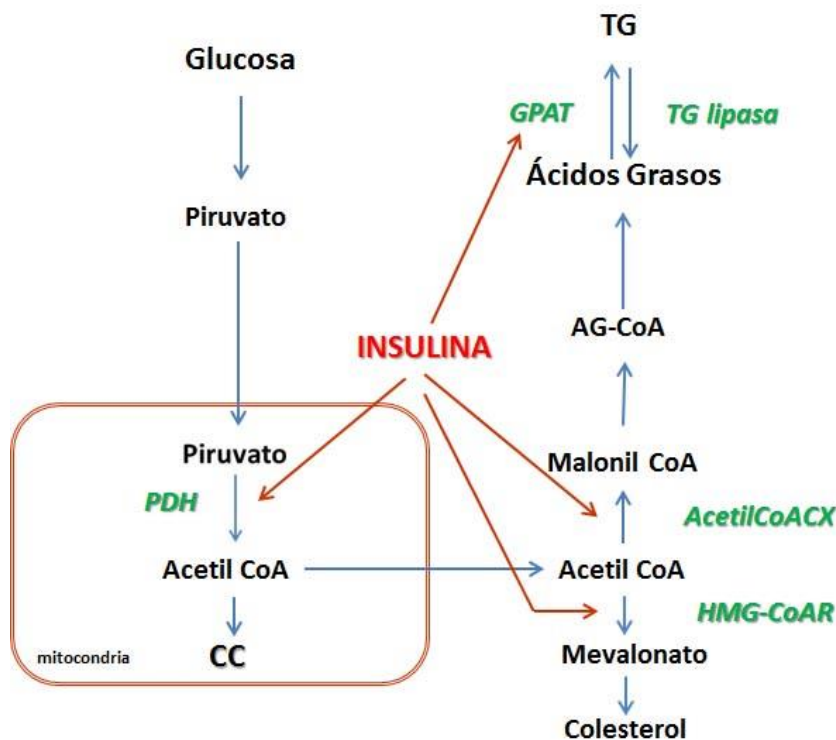


Figura 6.9. Metabolismo de Lípidos en Hígado y Tejido adiposo y su estimulación por acción de Insulina. PDH, piruvato deshidrogenasa; GPAT, gliceraldehido fosfo acil transferasa; TG lipasa, triglicérido lipasa; AcetilCoACX, acetil coA carboxilasa; HMG-CoAR, hidroximetil glutaril coA reductasa.

Otro efecto importante es la activación por insulina de la enzima *Lipoprotein Lipasa* (LPL), la cual se encuentra anclada en el endotelio vascular y tiene como función la degradación de los TG de las partículas de Quilomicrones y VLDL plasmáticos.

La biosíntesis de colesterol es otra vía regulada por acción de la insulina. Esta vía comienza con la condensación de dos moléculas de acetil CoA para producir acetoacetil CoA, el cual se convierte luego en beta-hidroxi-beta-metil glutaril CoA (HMG-CoA), y se reduce a mevalonato a través de la enzima *HMG-CoA reductasa* (HMG-CoAR). Luego de varias reacciones se produce el colesterol. La insulina aumenta la actividad de HMG-CoAR (Fig 6.9), mientras que el glucagon la inhibe.

En el hígado ocurre un proceso importante que es la síntesis de cuerpos cetónicos (CC): acetocetato, acetona y beta-hidroxibutirato (Figura 6.10). Estos compuestos se forman a partir de HMG-CoA en la mitocondria. Para esto se requiere que el Acil CoA o ácido graso CoA (AG-CoA) que llegan al hígado, ingresen a la mitocondria a través de un sistema de "lanzadera" o

transportador de acil grasas: carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I) / carnitina palmitoil transferasa II (CPT-II). Este sistema es inhibido por altas concentraciones de Malonil CoA, cuya síntesis es estimulada por acción de la insulina. De tal manera que en un estado pos prandial, cuando los niveles de glucemia y de insulinemia son altos, la síntesis de CC es reducida. Por el contrario, durante un ayuno, los niveles de insulina caen y se elevan los de glucagón y hormonas contra-regulatorias, lo cual estimula la movilización de ácidos grasos al hígado, los niveles de Malonil CoA serán bajos y el transporte de AG-CoA a la mitocondria aumenta, estimulando la oxidación y la formación de cuerpos cetónicos.

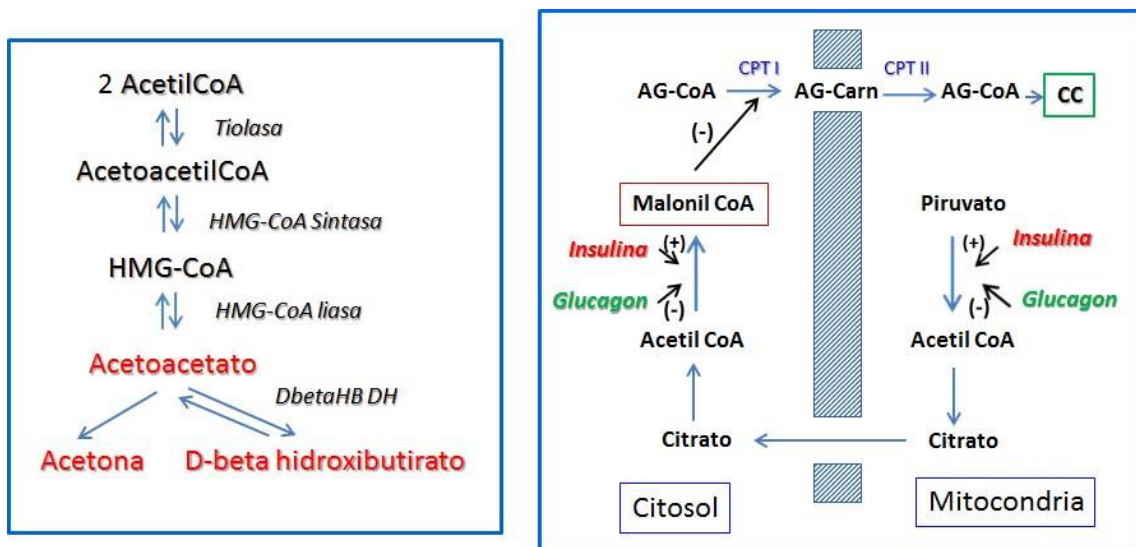


Figura 6.10. Síntesis de Cuerpos Cetónicos (izquierda) y su regulación (derecha) por Insulina y Glucagón en el hígado. Adaptado de Taylor, 1995

Efectos sobre el metabolismo de proteínas. La insulina in vitro es capaz de estimular el crecimiento de células en cultivo, aunque se cree que esto ocurre por su unión al receptor de IGF-I (factor de crecimiento insulino similar 1). La insulina puede estimular la síntesis de una gran variedad de proteínas/enzimas en diversos tejidos, y también ejerce un efecto regulatorio a nivel del ARNm.

In vivo, luego de una comida, la insulina promueve el almacenamiento de aminoácidos dietarios en los tejidos insulino-sensibles, principalmente el músculo esquelético. La estimulación de la síntesis de proteínas por insulina depende así de la disponibilidad de aminoácido y de la vasodilatación vascular. En el endotelio la insulina ejerce una respuesta vasodilatadora, mediada por activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), estimulando la producción de NO en las células endoteliales e induciendo relajación de los miocitos lisos vasculares, lo cual aumenta el flujo de nutrientes a los tejidos “blanco”. De hecho, la disfunción endotelial y/o la reducción de nutrientes inducen resistencia a los efectos anabólicos de la insulina. En el hígado, insulina estimula la síntesis de proteínas que son exportadas, como la albúmina. A nivel del cuerpo entero, la insulina reduce la degradación de proteínas.

DIABETES MELLITUS. Definición y Clasificación

La Diabetes mellitus se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, resultante de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas. Se hallan asociadas con complicaciones crónicas.

El término griego Diabetes, que significa "Fluir a través de un Sifón" (debido al exceso de orina ocasionado por la enfermedad), fue acuñado por primera vez en el año 163 de nuestra era, por Areteo (130-200), un médico de Capadocia. Mientras que el término latino *Mellitus*, que significa: "Sabor a Miel" (debido al dulzor de la orina cuando se hacía el diagnóstico catando la misma), fue acuñado por primera vez en el año 1674.

Esta enfermedad está caracterizada por varios procesos patogénicos. Los síntomas de hiperglucemia son poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia y visión borrosa. También se asocia con alteraciones en el crecimiento y susceptibilidad a infecciones. Las consecuencias agudas de la Diabetes son la hipoglucemia, la hiperglucemia con cetoacidosis y el síndrome hiperglucémico hiperosmolar no cetósico. Por otro lado, las complicaciones crónicas o a largo plazo que caracterizan a esta enfermedad pueden ser microvasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía periférica y/o autonómica) o macrovasculares por enfermedad aterosclerótica (infarto agudo de miocardio, accidente vascular periférico, accidente cerebrovascular).

La clasificación actual de la DM está basada en los conocimientos sobre su etiología y no en el tratamiento farmacológico. Se la clasifica en 4 categorías:

I. Diabetes tipo 1

Dstrucción de la célula beta, que generalmente conduce a un déficit absoluto de insulina. A. Inmunomediada. B. Idiopática

II. Diabetes tipo 2

Puede abarcar desde una insulino resistencia predominante con deficiencia relativa en la secreción de insulina, hasta un defecto secretorio predominante con insulino resistencia relativa.

III. Otros tipos específicos

Abarca una gran variedad de defectos de diversos orígenes (Tabla 6.1.)

IV. Diabetes mellitus gestacional

Cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se manifiesta por primera vez durante el embarazo en curso.

Tabla 6.1. Otros tipos específicos de Diabetes

A. Defectos genéticos de la función de la célula beta
Cromosoma 12, HNF-1 α (MODY3)
Cromosoma 7, glucoquinasa (MODY2)
Cromosoma 20, HNF-4 (MODY1)
Cromosoma 13, factor promotor de la insulina 1 (IPF-1; MODY4)
Cromosoma 17, HNF-1 β (MODY5)

<p>Cromosoma 2, NeuroD1 (MODY6) ADN mitocondrial Otros</p>
<p>B. Defectos genéticos en la acción de la insulina</p>
<p>Resistencia a la insulina tipo A Leprechaunismo Síndrome de Rabson-Mendenhall Diabetes lipoatrófica Otros</p>
<p>C. Enfermedades del páncreas exócrino</p>
<p>Pancreatitis Trauma/pancreatectomía Neoplasia Fibrosis quística Hemocromatosis Pancreatopatía fibrocalculosa Otros</p>
<p>D. Endocrinopatías</p>
<p>Acromegalia Síndrome de Cushing Glucagonoma Feocromocitoma Hipertiroidismo Somatostatina Aldosteronoma Otros</p>
<p>E. Inducida por drogas o químicos</p>
<p>Vacor Pentamidina Ácido nicotínico Glucocorticoides Hormona tiroidea Diazóxido Agonistas β-adrenérgicos Tiazidas Fenitoína α-Interferon Otros</p>
<p>F. Infecciones</p>
<p>Rubeola congénita Citomegalovirus Otras</p>
<p>G. Formas no comunes de Diabetes inmunomediada</p>
<p>Síndrome de “persona rígida” (Stiff-man) Anticuerpos anti-receptores de insulina Otras</p>

H. Otros síndromes genéticos asociados a veces con la Diabetes

Síndrome de Down
 Síndrome de Klinefelter
 Síndrome de Turner
 Síndrome de Wolfram
 Ataxia de Friedreich
 Corea de Huntington
 Síndrome de Laurence-Moon-Biedl
 Distrofia miotónica
 Porfiria
 Síndrome de Prader-Willi
 Otros

Los pacientes con cualquier forma de Diabetes pueden necesitar insulina en alguna etapa de su enfermedad. El empleo de insulina, por si misma, no clasifica al paciente.

DIABETES MELLITUS. Diagnóstico

El diagnóstico de DM puede hacerse evaluando la glucosa plasmática en ayunas (GPA), la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) o los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c). Los criterios originalmente fueron desarrollados por el *National Diabetes Data Group* (NDDG, 1979) y estaban basados en una asociación con la descompensación o Diabetes “sintomática”. En 1997, un Comité de Expertos para el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes mellitus re-examinó los criterios poniendo atención en la relación entre los niveles de glucemia y la presencia de complicaciones crónicas. En ausencia de síntomas claramente atribuibles a DM, el diagnóstico no puede basarse en una sola medida, sino que se requieren dos determinaciones en días separados (Tabla 6.2).

Tabla 6.2.

	Criterio para el diagnóstico de DM
1	Pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia, o crisis hipergluémica + GP casual 200 mg/dL (11.1 mmol/L)
2	GPA 126 mg/dL (7.0 mmol/L)
3	GP 200 mg/dL, 2 horas post-toma de 75g glucosa anhidra en una PTOG
4	HbA1c 6.5% usando un método certificado por NGSP y estandarizado a los ensayos del DCCT. No recomendado actualmente en la Argentina.

GP, glucosa plasmática; GPA, glucosa plasmática en ayunas; PTOG, prueba de tolerancia oral a la glucosa; NGSP, programa de estandarización de glicohemoglobina nacional de EEUU; DCCT, *Diabetes Control and Complications Trial*.

Según el criterio utilizado en pacientes asintomáticos, se los puede categorizar como sigue:

Según la glucemia plasmática en ayunas (GPA):

GPA < 110 mg/dl → **GAN** (Glucosa plasmática en ayunas **normal**)

GPA 110 y < 126 mg/dl → **GAA** (**G en ayunas alterada**)

GPA 126 mg/dl → **DM** (diagnóstico provisorio)

Según la Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG):

2h PG < 140 mg/dL → **TGN** (Tolerancia a la glucosa **normal**)

2h PG 140 y < 200 mg/dL → **TGA** (tolerancia a la glucosa **alterada**)

2h PG 200 mg/dL → **DM** (diagnóstico provisorio)

Según la HbA1c: (en este caso no se define un valor normal)

HbA1c 6.0 – 6.4 % **alto riesgo** de DM

HbA1c 6.5 % **DM**

Las denominaciones GAA y TGA se refieren a un estado metabólico intermedio, o prediabetes, entre la homeostasis glucémica normal y la diabética. Se consideran que son entidades clínicas que forman parte de la historia natural del desarrollo de la DM.

Respecto a la PTGO, existen una serie de requisitos previos que deben seguirse para su realización. Durante los últimos 30 días, el paciente debe estar sin patologías, especialmente infecciosas; y no debe haber ingerido drogas depresoras de K, beta-bloqueantes, salicilatos, hidantoínas, corticoides o inhibidores de la MAO. Durante los últimos 3 días, debe recibir una dieta rica en hidratos de carbono. Antes de la prueba debe estar con un ayuno no menor a 10h ni mayor a 16h. En el momento de la misma, recibe una carga oral de 75g glucosa anhidra en 375 mL de agua acidulada con jugo de limón. Durante las dos horas que dura la prueba, el paciente debe permanecer en un ambiente templado, sin fumar ni deambular. Al término de 2 horas de recibida la carga de glucosa, se hace una extracción de sangre para evaluar los niveles de glucosa plasmática.

Por otro lado, el uso de la HbA1c como marcador posee algunas ventajas, si se usa un método analítico dentro de los estándares NGSP. Es un ensayo predictivo del nivel de glucemia crónica, que demuestra una buena correlación con el riesgo de complicaciones crónicas de la DM. Posee menor variabilidad biológica que las medidas de GP en ayunas o que la PTGO; posee menos inestabilidad preanalítica; no se requiere tomar una muestra en ayunas; es relativamente no afectada por alteraciones agudas en los niveles de glucosa (estrés o enfermedades relacionadas); no se requiere confirmación en individuos sintomáticos con GP >200mg/dl y actualmente se usa para el seguimiento y ajuste terapéutico. Sin embargo, en la Argentina esta determinación presenta todavía un excesivo error analítico intra- e inter-ensayo; por lo cual no se la recomienda aún para el diagnóstico de DM (Sociedad Argentina de Diabetes – Fundación Bioquímica Argentina).

Para racionalizar los diferentes criterios diagnósticos, es necesario definir niveles equivalentes de hiperglucemia, ya sea que se use la GPA o la PTGO, y que esto represente un riesgo comparable para desarrollar alguna complicación crónica asociada con la DM. Diferentes estudios multicéntricos analizaron la relación entre GP en ayunas, a 2h post-PTOG y los niveles de

HbA1c, con la prevalencia de complicaciones microvasculares como retinopatía, definiendo los valores de corte para cada criterio diagnóstico. Las personas con valores por debajo del límite superior del intervalo de referencia no poseen riesgo incrementado, es decir que tienen un riesgo “normal” de desarrollar complicaciones crónicas asociadas a DM. Es decir, por encima del valor de corte, el grado de hiperglucemia refleja una anormalidad metabólica importante que se asocia con el desarrollo de complicaciones severas a largo plazo.

Es de destacar que los nuevos criterios tienen implicancias en la estimación de la prevalencia de DM. Usando los criterios de 1979, se estimaría una prevalencia de DM 14% menor que aplicando los criterios actuales (post-1997).

Debido a que existe un sub-diagnóstico de DM a nivel mundial (en nuestro medio se estima que 35-50% de los pacientes con DM no han sido diagnosticados), se ha propuesto una serie de criterios para la pesquisa de DM en individuos asintomáticos:

1. Debe considerarse la detección de Diabetes en todos los individuos de 45 años o más. De ser normal, debe repetirse cada 3 años.

2. La detección debe considerarse en personas menores de 45 años (o implementarse con mayor frecuencia) en individuos:

- Obesos ($\geq 20\%$ peso deseado o índice de masa corporal ≥ 27 Kg/m²)
 - Pariente en primer grado con DM
 - Perteneciente a un grupo étnico de $>$ riesgo para DM
 - Mujeres con diagnóstico previo de DM gestacional, o con antecedentes de macrosomía (RN $>$ 4kg)
 - Hipertensos (Presión arterial $\geq 140/90$)
 - Con niveles HDL-colesterol ≤ 35 mg/dl y/o de TG ≥ 250 mg/dl
- Con TGA o GAA en evaluaciones previas

DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1)

La Diabetes mellitus tipo 1 se debe a una destrucción de la célula B pancreática (habitualmente autoinmune) que lleva a un déficit absoluto de insulina. Se considera una enfermedad compleja, multifactorial, en la cual una predisposición genética y la exposición a factores del entorno promueven una reacción autoinmune contra las células beta pancreáticas. Se han identificados varios *loci* de susceptibilidad y algunos se mapearon en genes conocidos de participar en mecanismos inmunes. Se demostró la presencia de una respuesta inmune celular y humoral contra varios autoantígenos. Los más estudiados son la insulina/proinsulina, decarboxilasa de ácido glutámico (GAD65), una proteína tipo tirosina fosfatasa IA-2, la proteína relacionada con la subunidad catalítica de la G-6-fosfatasa específica de islote (IGRP) y el transportador de eflujo de cationes ZnT8.

Esta forma de Diabetes se desencadena usualmente en la niñez/adolescencia, aunque también puede diagnosticarse en la edad adulta. La incidencia de la DM1 varía en diferentes poblaciones: la menor incidencia se ha reportado en poblaciones asiáticas y algunos países

de sudamérica, mientras que la mayor incidencia se ha descrito en poblaciones caucásicas del mundo occidental.

Etiología de DM1

La predisposición genética es un factor importante en la patogénesis de esta enfermedad. Los hermanos de un paciente con DM1 tienen mayor riesgo de padecerla (3-6% de concordancia), también los hijos de una madre o padre afectado. La concordancia entre gemelos dicigóticos (mellizos) es de 8-10%, mientras que si son homocigóticos (gemelos) es del 60%. Esto sugiere que existen otros factores que contribuyen a la enfermedad, tales como factores del entorno y/o epigenéticos.

Uno de los *genes de susceptibilidad* identificados controla la respuesta inmune adaptativa, en particular la respuesta de los linfocitos T involucrados en la destrucción de las células beta. El *locus* mapea en el complejo HLA de clase II. Los genotipos DR3 y DR4, DQ2 y DQ8 presentan una fuerte asociación con el desarrollo de DM1. Alrededor del 30-50% de los pacientes con DM1 expresan estos genotipos, comparado con el 2% de la población general. A su vez, existen ciertos haplotipos que se asocian con una protección para el desarrollo de DM1. El polimorfismo que ocurre en las cadenas de la molécula DQ, por ej en la posición 57 de la cadena b, puede definir su capacidad para interactuar con la cadena a, y así unir y presentar autoantígenos pancreáticos. De esta manera y de acuerdo al haplotipo, existiría mayor o menor predisposición para el inicio de una respuesta inmune contra las células beta pancreáticas, aumentando o disminuyendo respectivamente el riesgo de desarrollo de DM1.

También se requiere de la presentación de autoantígenos durante el proceso de selección de linfocitos T que ocurre en el timo durante la maduración del sistema inmune, en el que se establece la auto-tolerancia inmunológica. Se sabe que tempranamente en la vida, durante el proceso de auto-tolerancia, el timo expresa antígenos que están restringidos a ciertos tejidos (TRA), es decir que se producen “ectópicamente” en el timo. La insulina es una de estas TRA, dado que su síntesis es prácticamente restringida a las células B pancreáticas. Su producción en el timo es crítica para establecer su auto-tolerancia y es modulada por variaciones alélicas y efectos epigenéticos en el locus del gen de la insulina. Defectos en este mecanismo pueden inducir fallas en el proceso de educación tímica, favoreciendo la selección de un repertorio de linfocitos T propenso a una respuesta autoinmune contra las células B pancreáticas (autorreactivas para insulina).

Entre los *factores del entorno* asociados con DM1 están los virus. Existe evidencia que así lo demuestra, por ej la incidencia de Diabetes correlaciona con la estacionalidad de infecciones por enterovirus. Los enterovirus pueden infectar el timo y alterar el proceso de selección tímica favoreciendo una respuesta autoinmune.

La *insulinitis* es una lesión inflamatoria de los islotes de Langerhans pancreáticos y constituye la característica destacada de la patogénesis de DM1, que se detecta durante el estado prediabético o al momento de su expresión clínica. Se han identificado múltiples linfocitos T que reaccionan contra varios autoantígenos del islote.

Una de las metas de los estudios genéticos en enfermedades complejas es poder identificar variantes de susceptibilidad que sean útiles para predecir el riesgo que posee un individuo de desarrollar la enfermedad. Actualmente, el mejor marcador de riesgo es la historia familiar positiva para DM1 y la presencia de autoanticuerpos contra antígenos de la célula beta pancreática. Sin embargo, más del 90% de los individuos con DM1 no tienen un pariente afectado. Por otro lado, el *screening* de autoanticuerpos en la población general es logísticamente inviable. Claramente se necesitan más estudios para poder identificar marcadores y blancos terapéuticos en la prevención de la DM1.

Patofisiología

La destrucción de la célula beta pancreática, a lo largo de los años lleva a un déficit absoluto en la secreción de insulina y al desarrollo de Diabetes. Además, se puede observar que hay una alteración en la función de las células alfa secretoras de glucagón, con una excesiva secreción de esta hormona. La hiperglucemia no parece suprimir la secreción de glucagón normalmente en pacientes con DM1, de tal manera que los niveles elevados de glucagón exacerban el cuadro de déficit de insulina. Después de varios años, los pacientes con DM1 desarrollan un defecto en la secreción de glucagón en respuesta a la hipoglucemia. Este defecto hace a los pacientes susceptibles a desarrollar hipoglucemia en respuesta al tratamiento con insulina.

El déficit de insulina genera cambios metabólicos similares a los que ocurren en un ayuno. En el hígado hay un aumento en la producción de glucosa, inicialmente como resultado de la movilización de glucógeno (glucogenolisis) y luego por aumento de la gluconeogénesis. Se observa una disminución en la utilización de glucosa por los tejidos periféricos y el hígado, debido a múltiples mecanismos. En el músculo y tejido adiposo, el déficit de insulina lleva a una disminución en el transporte de glucosa y su utilización, mientras que en el hígado, hay una disminución en la acción de la glucoquinasa. Como consecuencia de estos cambios se observa una marcada elevación en los niveles de glucosa plasmática. Cuando se supera el umbral renal (150-180 mg/mL) los riñones comienzan a liberar glucosa hacia la orina (glucosuria). El efecto osmótica de la glucosa lleva a la pérdida de agua y electrolitos en la orina (*poliuria*), la depleción de volumen activa entonces el mecanismo de la sed (*polidipsia*) con un excesivo deseo de ingerir líquido. Finalmente, el aumento en el catabolismo energético y la glucosuria inducen un aumento en el apetito (*polifagia*).

Por otro lado, en la Diabetes descompensada hay una rápida degradación de triglicéridos, lo cual eleva los niveles de ácidos grasos libres (AGL) plasmáticos, que van al hígado y otros tejidos para usarse como fuentes de energía. En el músculo, el aumento en los AGL inhibe el metabolismo de glucosa (Fig. 6.7), mientras que en el hígado hay un incremento en la producción de cuerpos cetónicos. Este proceso es estimulado por los bajos niveles de malonilCoA y activación de CPTI, resultantes del déficit de insulina y aumento de glucagón (Fig 6.10). La acción de la insulina es necesaria para estimular la LPL, enzima que hidroliza los TG de las lipoproteínas grandes (quilomicrones y VLDL), con lo cual los pacientes con DM1 desarrollan un cuadro de hipertrigliceridemia (dislipemia de tipo V según Fredrickson).

En la Diabetes descompensada se observa también un aumento en el catabolismo de proteínas, proteólisis de proteínas del músculo que llevan a un aumento de aminoácidos plasmáticos, los cuales sirven como sustratos para la gluconeogénesis.

Tratamiento

El tratamiento de los pacientes estará basado en el uso de insulina para sustituir el déficit generado por la destrucción de las células beta pancreáticas. Para esto existen diferentes tipos de insulinas, humanas recombinantes, que se inyectan en forma subcutánea. Existen las de acción corta y rápida (regular, Lispro); insulinas de acción intermedia (NPH y lenta); y de acción prolongada (ultralenta). También se han desarrollado insulinas de larga acción y lenta absorción, que mantienen los niveles de insulina elevados por 24h (glargina). A su vez, existen diferentes esquemas de tratamiento, con inyecciones de dos a cuatro veces por día, dependiendo de la alimentación, actividad física etc.

El tratamiento y control del paciente debe estar basado en un enfoque multidisciplinario, prestando atención a la educación diabetológica del paciente, un plan de alimentación balanceada y controlado por nutricionistas y un plan de actividad física controlada.

DIABETES MELLITUS TIPO 2

La Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se define como un síndrome que puede abarcar desde una insulino resistencia predominante con deficiencia de insulina relativa, hasta un defecto secretorio predominante con insulino resistencia relativa.

La susceptibilidad a esta enfermedad está determinada primariamente por factores genéticos. Estudios realizados con gemelos demostró una alta concordancia (aproximadamente del 90%). Esto es llamativo, dado que esta forma de Diabetes se manifiesta o detecta en la vida adulta, un momento en el cual usualmente los pares de gemelos viven separados y comparten pocos factores del entorno. Sin embargo, los genes de susceptibilidad no se han identificado claramente. La obesidad es uno de los principales factores determinantes/predisponentes para DM2.

Esta forma de Diabetes da cuenta del 80-90% del total de pacientes diabéticos. Se suele presentar en forma lenta, asintomática e insidiosa, generalmente después de los 40 años.

Etiología de la DM2

Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de la función/secréción de insulina por la célula beta pancreática, con incremento de la resistencia insulínica periférica. Varios estudios analizaron la función de la célula beta bajo diferentes situaciones metabólicas y clínicas y se estableció que una vez que la secreción de insulina no puede compensar la resistencia insulínica, la hiperglucemia se vuelve clínicamente significativa y aumenta el deterioro de la reserva de células beta residual. En la historia natural de la enfermedad, los individuos desarrollan primero una hiperglucemia pos

prandial, seguida por hiperglucemia en el ayuno, lo cual se puede detectar clínicamente (Figura 6.11). El seguimiento a largo término se acompaña de elevados niveles de HbA1c. Antes de la expresión completa de DM2 (prediabetes), los individuos con tolerancia a la glucosa normal desarrollan una progresiva resistencia a la insulina. El resultado de este proceso es una sobreproducción de glucosa endógena en el estado basal, a pesar de la presencia de hiperinsulinemia en el ayuno y una alteración de la supresión de la producción de glucosa posprandial, lo cual también es un indicador de la resistencia insulínica. Hay además una alteración en la captación y utilización de glucosa por los tejidos periféricos. A medida que el síndrome progresa, los individuos pasan a tener tolerancia a la glucosa alterada (IFG y/o IGT). Con el tiempo, las células beta son incapaces de secretar suficiente insulina como para sobrepasar esta resistencia insulínica de los tejidos.

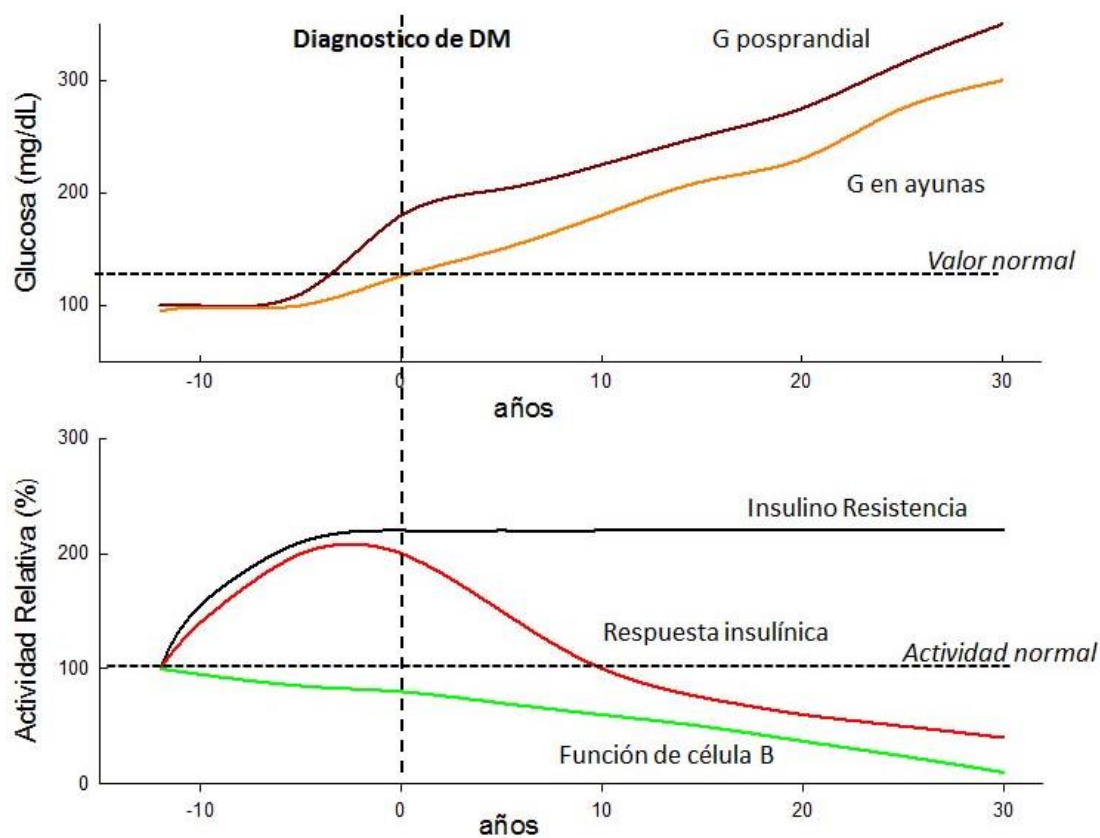


Figura 6.11. Historia natural en el desarrollo de la DM2. Adaptado de Cersosimo et al., 2014.

Patofisiología

De acuerdo a lo descrito previamente, es claro que hay dos componentes patofisiológicos en la DM2, la resistencia insulínica de los tejidos periféricos y la alteración en la secreción de insulina por parte de la célula beta pancreática.

La **Resistencia Insulina** podemos definirla como una disminución en la respuesta biológica frente una dada concentración de insulina. Si miramos una respuesta biológica, como por ej la captación de glucosa o la utilización de glucosa por un tejido, en función de la concentración de

insulina, obtendríamos una curva sigmoidea (Fig. 6.12). La cantidad de insulina necesaria para obtener la respuesta semi-maxima (50% del total) define la *sensibilidad* del tejido a la hormona y debería estar en el rango fisiológico de concentración de insulina plasmática. Por otro lado, la *capacidad o respuesta máxima* (100% de respuesta) es el efecto biológico máximo que se puede alcanzar en respuesta a la insulina. Los diferentes tejidos del organismo poseen diferentes sensibilidades y capacidades a la acción de la insulina fisiológicamente.

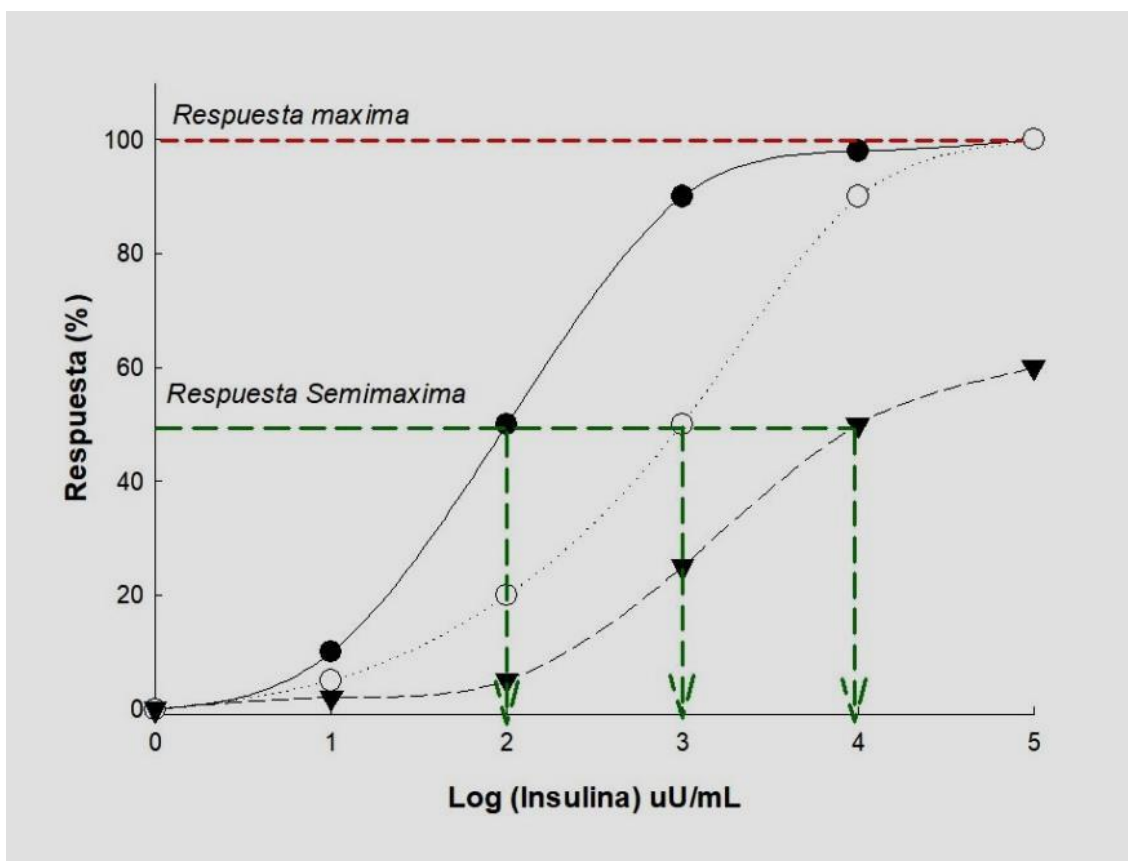


Figura 6.12. Curva dosis-respuesta para la acción de insulina. Los símbolos redondos negros representan la respuesta de un tejido normal, con una respuesta semimaxima que define la sensibilidad del mismo alrededor de 100 μM de insulina. Los puntos redondos vacíos representan un tejido que alcanza la respuesta máxima pero con menor sensibilidad (alrededor de 1.000 μM insulina), mientras que los triángulos muestran un tejido que no responde completamente a la acción de insulina (respuesta máxima del 60%) y presenta también menor sensibilidad a la hormona (aproximadamente 10.000 μM insulina). Adaptado de Espinal 1989.

Existen varios métodos para evaluar la acción de la insulina en un paciente. A nivel clínico se tiende a usar medidas simples, como los niveles de insulina plasmáticos en ayunas, o en conjunto con la glucemia basal para crear un modelo matemático que estime la resistencia insulínica. Uno de estos modelos es el de la homeostasis (HOMA), que se usó en los estudios prospectivos de Diabetes en el Reino Unido (UKPDS). Este estudio tuvo como objetivo hacer un seguimiento a largo término de la eficiencia de varios tratamientos usados en 1980 en una gran población de pacientes con DM2. El HOMA se calcula usando la concentración sanguínea en ayunas de la glucosa e insulina plasmáticas, para estimar el grado de deficiencia de la célula beta y la sensibilidad de los tejidos “blanco” a la insulina (o su recíproca, la resistencia). El modelo se basa en

la interacción y retroalimentación entre la regulación de la producción de glucosa dependiente de insulina y la respuesta de la célula beta a la concentración de glucosa. Se puede definir un índice HOMA-B para evaluar o estimar la función de la célula beta pancreática y un índice de resistencia insulínica en ayunas, HOMA-IR.

$$\text{HOMA-B} = [\text{Ins}]_{\text{pl}} \times 20 / [\text{G}]_{\text{pl}} - 3.5$$

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Ins}]_{\text{pl}} \times [\text{G}]_{\text{pl}} / 22.5$$

Para valores plasmáticos en ayunas de glucemia en mmol/L y de insulinemia en mU/mL.

Por convención, una persona sana, con peso normal y de menos de 35 años de edad tendrá un HOMA-B = 100% y un HOMA-IR = 1.0. Ambos índices correlacionan bien con otros métodos de evaluación como el *clamp* euglucémico-hiperinsulinémico.

Utilizando la PTOG, y determinando la glucemia, insulinemia y glucagonemia, se puede evaluar en una forma más fisiológica y dinámica la respuesta de las células beta y la resistencia insulínica periférica. Después de una carga de 75g de glucosa, se toman muestras de plasma a diferentes tiempos y es posible estimar la velocidad de secreción de insulina correspondiente a la 1era fase (aguda) y segunda fase de secreción de insulina en forma combinada. Se obtienen a partir de las áreas debajo de la curva de insulina, la 1era fase en los primeros 30 minutos y la segunda fase entre los 30-120 o 180 minutos después de la carga de glucosa. La figura 6.13 muestra la cinética de respuestas para individuos con diferente grado de tolerancia a la glucosa. Los individuos con una TGN responden al aumento en la glucosa plasmática con una rápida y lineal liberación de insulina que alcanza un pico a los 60 minutos y luego baja con la concomitante caída en la glucemia a los 180 minutos. En paralelo se observa una rápida caída en los niveles de glucagón que se estabiliza a los 90 minutos y se mantiene hasta los 180 minutos cuando se alcanzan los niveles basales de glucemia. Los individuos con TGA (euglucemia e hiperinsulinemia basal) muestran también una respuesta secretoria de insulina rápida y lineal hasta los 60 minutos, pero los altos niveles de insulina se mantienen elevados hasta los 120 minutos y luego caen lentamente aunque se mantienen elevados a los 180 minutos, aun con hiperglucemia. Es evidente que los pacientes con TGA son resistentes a la acción de la insulina. Por otro lado, se observa también una menor respuesta del glucagón frente al aumento de la glucemia. Finalmente tenemos un grupo de pacientes diabéticos (con valores de glucemia basal elevados, hiperinsulinemia e hiperglucagonemia) que muestran una elevada glucosa plasmática que se sostiene a lo largo de todo el estudio, con un pico a los 90 minutos. Frente a esta hiperglucemia, la célula beta responde con un aumento en la secreción de insulina pero cuya pendiente es menor a la de los individuos sanos, sugiriendo una disminución en la velocidad de secreción de insulina. Por otro lado, la células alfa no responden a la hiperglucemia, por el contrario se observa un aumento en la secreción de glucagón que se mantiene a lo largo del estudio.

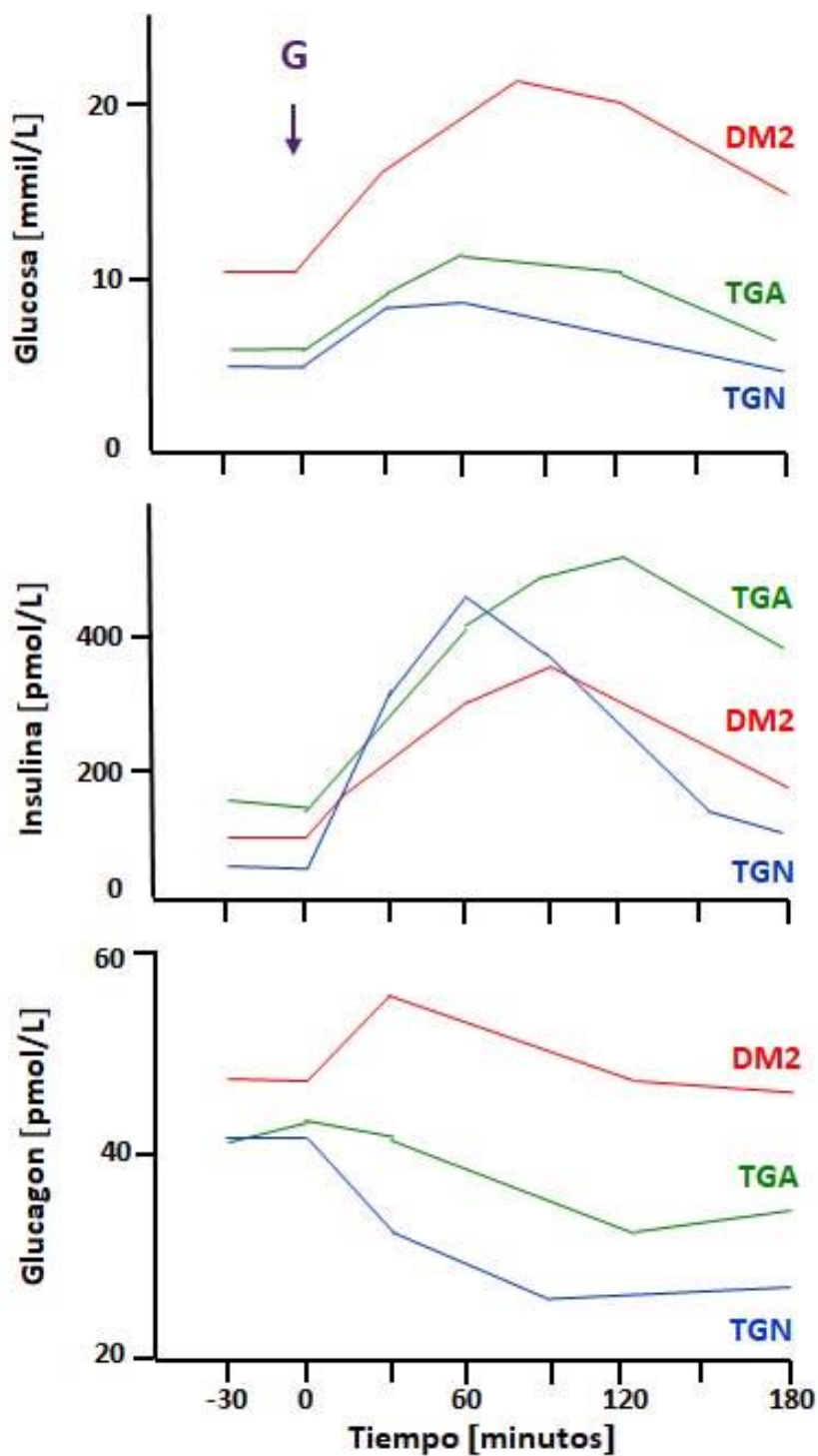


Figura 6.13. PTOG en individuos con diferente grado de tolerancia a la glucosa. Luego de una carga de 75g de glucosa (G), se evalúa la cinética de los niveles de glucosa, insulina y glucagón en muestras de plasma. TGN, tolerancia a la glucosa normal; TGA, tolerancia a la glucosa alterada; DM2, Diabetes mellitus tipo 2. Adaptado de Cersosimo et al., 2014.

A nivel de investigación clínica, se usan medidas más precisas y dinámicas de la acción de insulina, como son el *clamp* euglucémico-hiperinsulinémico (el “estándar de oro”) o la prueba de tolerancia a la glucosa intra-venosa. También se pueden evaluar otras características asociadas con el síndrome de resistencia insulínica como el aumento en la presión sanguínea, el índice de masa corporal, la relación cintura/cadera, etc.

En el método de *clamp* insulinémico, al paciente que está hospitalizado, se le infunde en forma intra venosa insulina a una velocidad como para alcanzar un nivel deseado de insulina plasmática. Si no se realiza otra intervención, se espera que el aumento en la insulina plasmática lleve a una caída en la glucemia. Para evitar esto, se infunde también glucosa en forma i.v. a una velocidad suficiente como para mantener la glucosa en un nivel basal normal (90 mg/dL), en el estudio de *clamp* euglucémico. Como los niveles de glucemia se mantienen en un estado estacionario, la velocidad a la cual se infunde glucosa debe ser igual a la utilización de glucosa por todo el cuerpo. De esta manera es posible construir una curva dosis-respuesta para la utilización de glucosa corporal total en función de los niveles de insulina plasmática. Este es en realidad un análisis muy simplificado, dado que como sabemos la insulina tiene diferentes efectos sobre diferentes tejidos y estos a su vez presentan diferentes sensibilidades a la hormona. Se han desarrollado métodos para poder valorar la contribución relativa de cada tejido. Estos estudios demostraron que la mayoría de los tejidos “blanco” son resistentes a la acción de la insulina en diferentes situaciones patológicas, como la DM2. Por ej, en individuos sanos, la estimulación semimaxima de utilización de glucosa se observa a concentraciones de insulina de 60 $\mu\text{U/mL}$, mientras que la respuesta máxima se obtiene con concentraciones de 600-700 $\mu\text{U/mL}$. En pacientes con DM2 se encuentra una marcada disminución en la respuesta máxima y también en la sensibilidad a la insulina. También es posible medir la resistencia del tejido adiposo, evaluando los niveles de ácidos grasos libres plasmáticos. Una función importante de la insulina es inhibir la lipólisis que libera AG desde los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo. En estudios de *clamp* insulinémico se observó que la inhibición máxima se encontraba alrededor de 50 $\mu\text{U/mL}$ de insulina, mientras que la inhibición semimaxima se alcanza a concentraciones de insulina de 10-20 $\mu\text{U/mL}$. Sin embargo, en pacientes con DM2 el proceso lipolítico es menos sensible a la inhibición por insulina.

Como dijimos, la **deficiencia insulínica** es otro componente importante en la patogénesis de la DM2. Se ha observado que hay una disminución de aproximadamente 20-50% (35% en promedio) en la masa de las células beta pancreáticas en pacientes con DM2 y también en individuos con prediabetes. Sin embargo esto por sí solo no es suficiente para desencadenar el cuadro de Diabetes, debe existir además un defecto en la función de las células beta remanentes. Varios estudios in vivo y ex vivo, han documentado la disminución en la función secretoria de insulina en DM2. Tanto la apoptosis como la autofagia anormal pueden explicar la desaparición de las células beta. Existen múltiples factores asociados con la falla en la función de la célula beta (Fig. 6.14). La *edad* está de por sí asociada con una disminución en la función de la célula beta, lo que coincide con la observación bien establecida de que la incidencia de DM2 aumenta con el avance de la edad. Varios *genes* se han asociado con DM2 en diferentes poblaciones, de estos los más comunes son factores de transcripción asociados con la función de la célula beta o el gen de la Glucoquinasa asociada con la forma MODY de DM (tabla 6.1). La *resistencia insulina* presente en la DM2, impone una gran demanda a la célula beta para incrementar la secreción de insulina y esta situación contribuye al progreso de la falla de la célula beta. La *lipotoxicidad* (acumulación de lípidos en la célula beta) es otro factor que afecta la función secretoria, como consecuencia de los elevados niveles de

AG circulantes. Se demostró a través de estudios *in vitro* con islotes aislados incubados por 48h con AG libres, que se produce una disminución en la secreción de insulina, inhibición de la expresión del ARNm para insulina y reducción en el contenido de insulina del islote. Se demostró que los agonistas PPAR γ (como la rosiglitazona) son capaces de prevenir todas estas alteraciones inducidas por los AG libres. *In vivo*, el tratamiento de los pacientes con este tipo de drogas, mejoran la relación secreción de insulina/resistencia insulínica y la pérdida de peso, que moviliza las grasas, también revierte la lipotoxicidad y la función de la célula beta. Otro factor, la *glucotoxicidad*, es decir la exposición crónica a altas concentraciones de glucosa circulante, también altera la función de la célula beta. La excesiva secreción de péptidos tipo amilina, con subsecuente deposición de *amiloid* en la célula beta, también contribuye a su deterioro.

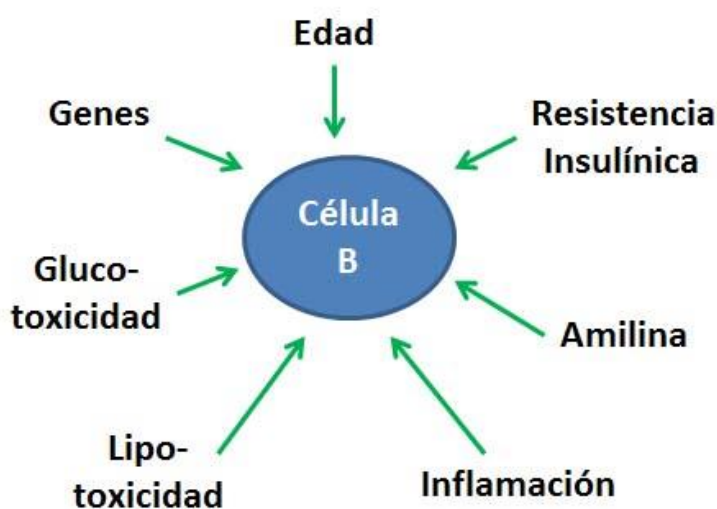


Figura 6.14. Factores patogénicos implicados en el daño progresivo de la célula B durante el desarrollo de la DM2. Adaptado de De Fronzo 2015.

En resumen, aunque la resistencia insulínica es un evento bien establecido desde el inicio de la historia natural de la DM2, la misma no se manifiesta completamente en ausencia de una falla progresiva de la célula beta pancreática.

Como ya describimos, es posible evaluar la función de la célula beta a través de métodos simples (HOMA-B) o más complejos como la prueba de tolerancia a la glucosa intra venosa (PTGIV) (20g i.v.). Cuando se realiza esta última prueba en individuos normales, hay una respuesta rápida (alrededor de los 10 min) que resulta en un pico de insulina plasmática de 100 $\mu\text{U}/\text{mL}$. Por el contrario, en pacientes con DM2, la respuesta aguda se ve retardada y el pico de insulina es mucho más bajo. Debe tenerse en cuenta sin embargo, que la respuesta insulínica durante la PTGIV es no fisiológica, dado que la ruta i.v. nunca ocurre bajo circunstancias normales y saltea el efecto de la ruta intestinal donde la glucosa estimula la secreción de incretinas y esto a su vez, la secreción de insulina.

Tratamientos

En los individuos con DM2, la obesidad se asocia con un estado de resistencia insulínica junto con hiperinsulinemia. Esto es el resultado de una combinación de hipersecreción de insulina y reducido *clearance* de insulina. Si los pacientes obesos con DM2 pierden peso, se observa también una disminución en la resistencia insulínica y un aumento en la respuesta de las células beta, posiblemente debido a una disminución en la glucotoxicidad y lipotoxicidad. Así, la pérdida de peso se acompaña de un mejor control diabético. Por lo tanto, **intervenciones en el estilo de vida** se consideran como la primera línea de tratamiento para pacientes pre-diabéticos o con reciente diagnóstico de DM2. Esto incluye educación diabetológica, programas de ejercicios y un plan de alimentación.

Los agentes terapéuticos **antidiabéticos** incluyen varias drogas que actúan por diferentes mecanismos regulando la hiperglucemia (Tabla 6.4).

Tabla 6.3

Droga Antidiabetica	Mecanismos de acción	Efectos
Sulfonilureas (Glibenclamida)	Unión a receptores (SUR-1) que acopla al canal de K ⁺ dependiente de ATP y cierran el canal por un mecanismo independiente de G	↑ secreción de insulina, hipoglucemia, ganancia de peso, riesgo cardiovascular
Biguanidas (Metformina)	Inhibe complejo mitocondrial I, ↑ AMP/ATP y AMPK ↓ producción G hepática, ↓ absorción de G intestinal	↓ GPA y GPP, Insulino sensibilizante, pérdida de peso, ↓ IR, ↓ complicaciones micro y macrovasculares
Tiazolidindionas (Rosiglitazona, Pioglitazona)	Agonista PPAR _γ Actúan sobre tejidos dependientes de insulina. ↓ IR	Sensibilizador de Insulina, mejora control glucémico Ganancia de peso
Inhibidores de α-glucosidasa (Acarbosa)	↓ α-glucosidasa intestinal, ↓ absorción de G intestinal,	↓ GPP, ↓ pico de Insulina, efectos gastrointestinales, no ganancia de peso, buen perfil de seguridad
Inhibidores de DPP-4 (dipeptidil peptidasa-4) Sitagliptina, Saxagliptina	Bloquean la acción de DPP-4 que degrada GLP-1 y GIP (incretinas)	Regulan la glucemia, No afectan el peso corporal
Incretinas (Liraglutide, Exenatide)	Agonista del receptor GLP-1	Regula la glucemia, no provoca hipoglucemia, ↓ peso corporal, ↓ riesgo cardiovascular

Las incretinas (GLP-1 y GIP) son hormonas que se secretan a nivel intestinal por las células enteroendócrinas en respuesta a la ingesta de alimentos. Son de vida media muy corta, debida a su rápida degradación por acción de la DPP-4 (dipeptidil peptidasa-4). Estas hormonas estimulan la secreción de insulina in vivo (normalmente dan cuenta del 60% de su secreción postprandial), disminuyendo así los niveles de glucosa sanguínea. Se han desarrollado inhibidores de esta enzima que potencian la acción de incretinas, o agonistas del receptor de GLP-1 resistentes a DPP-4, mejorando el control glucémico.

Complicaciones

Las complicaciones asociadas con la DM pueden dividirse en dos tipos, Agudas y Crónicas (Tabla 6.4).

Tabla 6.4

Complicaciones	Tipo	Característica
AGUDAS	Hiperglucemia con cetoacidosis	GPA > 300 mg/dL Cetonemia, cetonuria, acidosis
	Hipoglucemias	GPA < 50 mg/dL
	Coma Hiperglucémico Hiperosmolar no cetósico	GPA > 600 mg/dL Osmolaridad pl > 320 mOsm/L
CRONICAS	Microangiopatías	Retinopatías – Nefropatías - Neuropatías
	Macroangiopatías	Ateroscleróticas: Cardiovascular – Cerebrovascular – Vascular periférica
	Mixtas	Pie diabético - Osteopatías

Complicaciones Agudas

La **cetoacidosis** diabética consiste de tres componentes que pueden causar una variedad de situaciones: la hiperglucemia, la acidosis y la cetonemia. Se la puede definir en base al pH sanguíneo, bicarbonato, cetonas y alteraciones sensoriales. La Cetoacidosis se define como un estado de descompensación metabólica caracterizada por hiperglucemia, acidosis metabólica y aumento en los cuerpos cetónicos totales, es decir cetoacidosis. Esta situación se asocia con una deficiencia de insulina y aumento de hormonas contraregulatorias que alteran el metabolismo

de carbohidratos, lípidos y proteínas, como así también un desbalance de fluidos y electrolitos. Estos cambios se asocian con un aumento en los AG libres circulantes, que llegan al hígado para ser metabolizados y son precursores para la síntesis de cuerpos cetónicos (Fig 6.10).

En el estado **hiperosmolar hiperglucémico**, que se asocia con muy elevada hiperglucemia (> 600 mg/dL) sin cetoácidos, osmolaridad sérica > 330 mOsm/kg, puede haber glucosuria y diuresis osmótica cuando se excede el umbral renal para la reabsorción de glucosa (\cong 200 mg/dL). Debido al arrastre osmótico de la glucosa, se pierden por vía urinaria agua, Na, K y otros electrolitos. Las alteraciones del sensorio incluyen letargo, inconciencia y coma. El mecanismo patogénico de esta complicación insidiosa, es una reducción en la concentración efectiva neta de la insulina circulante, concomitante con la elevación de las hormonas del estrés o contraregulatorias (glucagon, catecolaminas, cortisol, y hormona de crecimiento) en asociación con una deshidratación severa. La hiperosmolalidad plasmática resultante genera deshidratación neuronal a nivel del SNC, con depresión del sensorio y coma.

Patofisiología de las Complicaciones Crónicas

Los pacientes con DM1 y DM2 con frecuencia desarrollan complicaciones vasculares crónicas. Existen varios factores patofisiológicos asociados con el desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM (Fig. 6.15).

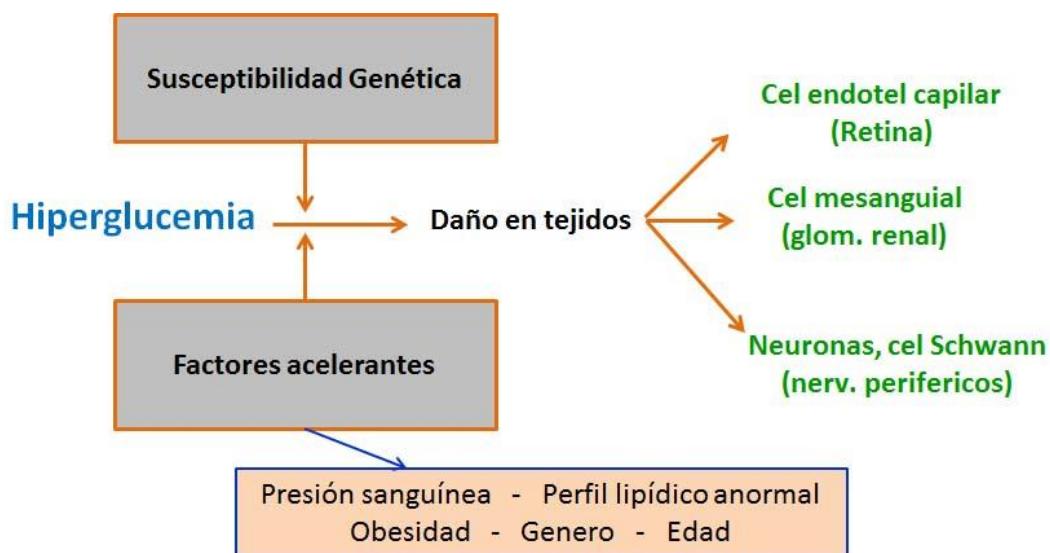


Figura 6.15. Factores patogénicos en el desarrollo de las complicaciones microvasculares.

Los tratamientos corrientes solo pueden retrasar el progreso de la enfermedad; sin embargo, se ha destacado la importancia de un estricto control glucémico como el determinante más importante en la progresión de las complicaciones microvasculares. En estudios clínicos multicéntricos como el DCCT, se observó el impacto de un estricto control glucémico inicial en reducir el riesgo de desarrollo de complicaciones microvasculares en pacientes con DM1. Sin embargo, en

el estudio UKPDS se observó que los pacientes con DM2 pueden desarrollar complicaciones crónicas a pesar de un estricto control glucémico. Se ha postulado que existe una “*memoria metabólica*”, donde el organismo recuerda episodios de buen o mal control glucémico. Es decir, la hiperglucemia puede ser “recordada” por órganos como los vasos sanguíneos, riñón, corazón y ojos. Se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares que subyacen a esta memoria metabólica. La explicación más probable para este fenómeno es la de **mecanismos epigenéticos** (ver Cap 2) inducidos por la hiperglucemia sobre la metilación de ADN o modificación de histonas que modularían la expresión de genes vasculares y que persiste aun volviendo a la normoglucemia. Diferentes estudios demostraron cambios en la expresión y actividad de histonas (relacionadas con genes involucrados en procesos inflamatorios) en respuesta a la hiperglucemia, en sitios de complicaciones diabéticas, la mayoría en células endoteliales. También, los miARN podrían jugar un rol en el proceso epigenético. En conjuntos estos mecanismos podrían regular diferentes vías de transducción de señales y de esta manera la expresión de genes que modifiquen la susceptibilidad a las complicaciones crónicas como aterosclerosis, cardiomiopatías o complicaciones microvasculares.

La hiperglucemia afecta principalmente a órganos que son “propensos” a desarrollar complicaciones, que tienen dificultades en modular el transporte y metabolismo de glucosa. En particular, las células de estos tejidos captan la glucosa a través de un sistema que permite equilibrar rápidamente la concentración intracelular con la glucosa circulante, de tal manera que si hay hiperglucemia, el interior celular se verá expuesto a los mismos niveles de glucosa. La glucosa intracelular es rápidamente derivada a varias vías metabólicas, principalmente vía glicolítica, pero también a otras vías como la de hexosaminas, y eventualmente se puede alterar la producción de energía celular.

Existen varias hipótesis para tratar de explicar el daño tisular asociado con la hiperglucemia y al eventual desarrollo de complicaciones crónicas en diversos tejidos.

Una hipótesis incluye la **vía de los Polioles** y la acción de **Aldosa Reductasa (AR)**. Bajo condiciones fisiológicas, la AR posee un rol detoxificante de aldehídos en alcoholes (Fig 6.16). La AR se expresa principalmente en riñón (podocitos, células mesangiales, epitelio tubular), tejido nervioso (axones y células de Schwann) y en el ojo (epitelio corneal, cristalino y pericitos retinales). Esta enzima posee baja afinidad por la glucosa, de tal manera que es activa en condiciones de hiperglucemia. Bajo estas circunstancias, la glucosa se transforma en sorbitol, con depleción de NADPH. La caída en el NADPH lleva a una disminución en la acción de las enzimas glutatión reductasa (GluR), con disminución en los niveles de GSH y de óxido nítrico sintasa (NOS), con depleción de NO, producto vasoactivo. Esto puede llevar a una situación de vasoconstricción e hipoxia tisular. A su vez, el sorbitol acumulado que no difunde a través de las membranas, altera la osmolaridad celular exaltando el estrés oxidativo. El sorbitol también puede ser transformado en Fructosa por acción de sorbitol deshidrogenasa (SDH), en una reacción que requiere NAD⁺ como cofactor. El consumo y caída en los niveles de NAD⁺ (semejante a una hipoxia) inhiben la enzima gliceraldehído fosfodeshidrogenasa (GAPDH) con acumulación de gli-

ceraldehido-3-P y dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Estos productos intermedios glicolíticos generan estrés oxidativo (ROS, especies de oxígeno reactivas) y a su vez, a partir de DHAP se forma diacil glicerol (DAG). Se ha reportado que los altos niveles de DAG se mantienen elevados en forma crónica en pacientes diabéticos y en consecuencia también se produce la activación de la PK-C. Esta enzima participa en múltiples mecanismos de transducción de señales y activación de diversos genes (por ej. de proteínas de matriz extracelular) asociados con el desarrollo de las complicaciones crónicas. Todos estos cambios pueden llevar a la muerte celular.

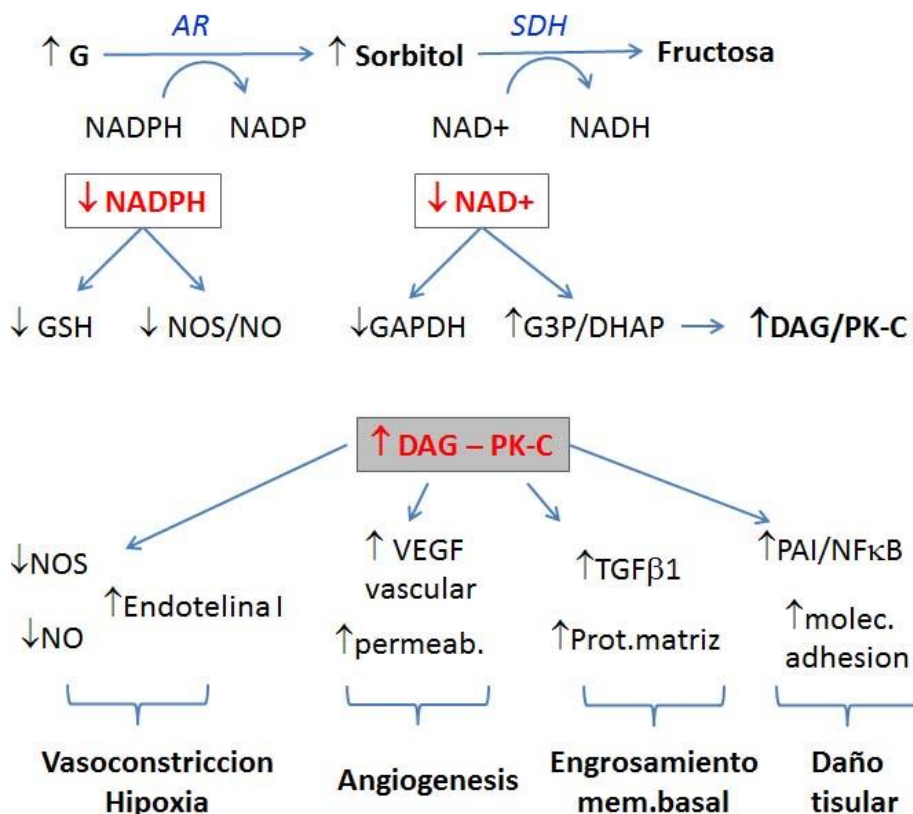


Figura 6.16. Hipótesis de la vía de Polioles y daño tisular asociado a las complicaciones crónicas. Adaptado de De Fronzo, 2015

Otra de las hipótesis que trata de explicar el desarrollo de las complicaciones crónicas es la de la **glicosilación no enzimática** o **glicación** o glicoxidación y formación de Productos de glicación avanzados (**PGA**, o **AGEs** en inglés, *advanced glycation end-products*). Esta hipótesis se basa en la reacción, por acción de masas, de glicación de grupos amino libres de las proteínas (amino terminales o de lisinas) por acción de elevados niveles de glucosa (Fig 16.17), formándose primero una base de Schiff inestable que rápidamente se reorganiza para dar lugar a la formación de aldminas y productos de Amadori (por ej la HbA1c). Hasta aquí la reacción puede ser reversible y llega a su equilibrio a los 28 días, o sea que es posible disminuir los productos de Amadori bajando los niveles de glucosa. Sin embargo, si la hiperglucemia persiste, estos productos sufren una serie de reacciones de condensación, oxidorreducción y deshidratación, dando lugar a la formación de productos de estructura química no totalmente conocida pero que

son muy estables y se acumulan sobre proteínas de vida media larga, inhibiendo su degradación. Por ej, las proteínas de matriz extracelular, como el colágeno o proteínas de la vaina de mielina. Algunos AGEs también pueden formarse a partir de compuestos dicarbonílicos, como el metilglioaxal y 3-desoxiglucosona, que derivan del metabolismo de glucosa, por mecanismos no oxidativos en condiciones de hiperglucemia. Otros dicarbonilos pueden originarse de procesos oxidativos a partir de intermediarios glicolíticos o de lípidos poliinsaturados, así es que su formación aumenta en situaciones de estrés oxidativo con hiperlipemia y/o hiperglucemia. También se ha demostrado que algunos AGEs pueden ser de origen exógeno, por consumo de ciertos alimentos o a través del humo del cigarrillo. Por ej. el alto consumo de fructosa, puede generar estrés carbonílico, formación de AGEs y daño tisular (Fig. 6.17).

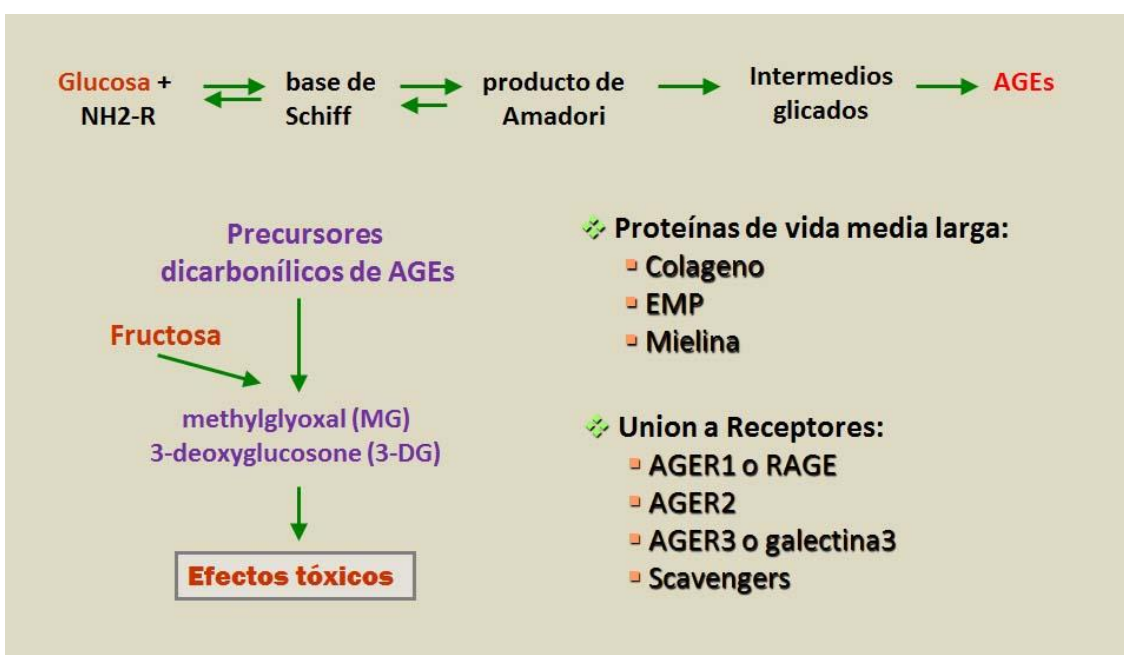


Figura 6.17. Glicación no enzimática y formación de AGEs.

Algunos AGEs acumulados son fluorescentes y pueden ser detectados por métodos basados en esta característica. Su acumulación sobre las proteínas altera sus propiedades y/o funciones, originando daño a los tejidos donde se acumulan. Además, se ha demostrado que interactúan con receptores de superficie celular (AGER, receptores para AGEs), el mejor caracterizado es el RAGE. Como consecuencia se desencadenan señales intracelulares que aumentan los ROS, NF κ B intracelulares, aumentan las citoquinas pro-inflamatorias, y lleva a alteraciones en la función celular y daño tisular.

En definitiva, en la Diabetes descompensada, se genera un aumento en los ROS por diversos mecanismos (vía de los polioles, disfunción mitocondrial, oxidación de glucosa, peroxidación lipídica, aumento en PKC, vía de hexosamina y producción de AGEs), que promueve el daño oxidativo en distintos tejidos, incluyendo el daño vascular y que terminan en las complicaciones micro y macro vasculares.

Complicaciones Microvasculares

La **retinopatía diabética** (RD) es una complicación que afecta a un tercio de las personas con Diabetes y es la principal causa de pérdida visual reversible entre los individuos en edad laboral. La RD se caracteriza por cambios y alteraciones en la vasculatura retinal que incluyen hemorragias, microaneurismas, y dilatación de venas y arterias. Durante su progreso, aparecen áreas de no perfusión y aumentada permeabilidad capilar, con edema y exudados retinales (*retinopatía no proliferativa*) y aumento en la proliferación de vasos sanguíneos intraoculares que llevan a hemorragias y glaucoma neovascular, lo cual se asocia con pérdida de la visión. A esto sigue la oclusión de capilares con isquemia e infarto de la capa neural y aparición de exudados algodonosos (*retinopatía pre-proliferativa*). En una etapa final hay neovascularización, proliferación celular dentro de la cavidad vítrea, con hemorragias y fibrosis (*retinopatía proliferativa*), retracción de la retina y ceguera.

Se sabe que hay varios factores de riesgo importantes asociados con el desarrollo de la RD, algunos que pueden ser modificables y otros no. Entre los primeros tenemos, principalmente la hiperglucemia, hipertensión y la dislipemia. Por ej., reduciendo los niveles de HbA1c en 1% a través de un control glucémico intensivo, es posible disminuir el riesgo de RD entre un 15 a 40%. Lo mismo ocurre si se consigue reducir la hipertensión; sin embargo, los resultados respecto de la correlación con el control de los niveles de lípidos séricos son inconsistentes. Entre los factores no modificables se encuentra el género, la etnia (mayor prevalencia y severidad de RD en individuos afro-americanos, hispanos y sud asiáticos que en blancos caucásicos), la predisposición genética, o la duración de la DM. En un estudio epidemiológico (WESDR, Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy) se reportó que después de 20 años de duración de Diabetes, aproximadamente el 99% de los pacientes con DM1 y el 60% de los pacientes con DM2 desarrollaron RD. A las personas con Diabetes se les recomienda que se hagan un examen de fondo de ojos con dilatación regularmente, para evaluar la presencia de RD. La fotocoagulación con láser puede prevenir la pérdida visual en estados de retinopatía proliferativa y edema macular diabético. Además se han desarrollado y se puede usar en forma intraocular, inhibidores del VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular), anticuerpos monoclonales contra VEGF o una proteína similar al receptor soluble, para casos de edema macular diabético.

La patogénesis de esta complicación se asocia directamente con la exposición crónica a la hiperglucemia, la cual desencadena una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que llevan a alteraciones microvasculares de la retina. Entre ellos (Fig 16.16 y 16.17), la acumulación de sorbitol, AGEs y ROS, activación de PK-C, inflamación y VEGF.

Además de la RD, la Diabetes se asocia con otras complicaciones que pueden afectar la visión, como el desarrollo de **cataratas** o de **glaucoma**. La catarata es una opacidad del cristalino, que ocurre como consecuencia de la precipitación de proteínas, lo cual conduce a la opacidad del cristalino, con lo cual no deja pasar la luz a la retina y la visión se vuelve borrosa y distorsionada.

La **nefropatía diabética (ND)**, responsable de la mitad de los pacientes en hemodiálisis con enfermedad renal terminal en los países occidentales, afecta a alrededor de la mitad de los individuos con DM1, y al 20% de los pacientes con DM2. La enfermedad renal diabética (ERD), en realidad, incluye un espectro de enfermedad renal crónica clínica e histopatológica. La ND se define específicamente como la presencia de proteinuria persistente y detectable clínicamente, asociada con elevada presión sanguínea, y disminución en la velocidad de filtración glomerular. En la historia natural de la ERD se reconoce un estadio de proteinuria subclínica o microalbuminuria, que puede definirse en base a la velocidad de excreción de albumina (VEA) y a la relación entre albuminuria y creatininuria (RAC) (Tabla 6.5).

Tabla 6.5. Clasificación de Albuminuria

Albuminuria	VEA		RAC (mg/mmol / mg/g)	
	µg / min	mg / día	Mujeres	Hombres
Normoalbuminuria	< 20	< 30	< 3.5 / < 35	< 2.5 / < 25
Microalbuminuria	20 - 200	30-300	3.5–35/35-350	2.5-25/25-250
Macroalbuminuria	> 200	> 300	> 35 / > 350	> 25 / >250

Aunque los factores determinantes iniciales de la ERD son la hiperglucemia e hipertensión, evidencia reciente indica que factores genéticos, epigenéticos y nutricionales están involucrados en el desarrollo y progreso de la enfermedad. Aun no se ha identificado un gen determinado (se han propuesto genes candidatos) como el determinante de la ERD. Por otro lado, la obesidad es un factor predisponente para el desarrollo de glomeruloesclerosis focal, y puede contribuir a una disminución en la velocidad de filtración glomerular. Los AGEs exógenos, al igual que los productos derivados de la peroxidación lipídica, también podrían contribuir al deterioro de la función renal en pacientes diabéticos. Entre los mecanismos moleculares desencadenados por los AGEs y su interacción con el RAGE, se encuentra la estimulación de PK-C, NFκB y TGFβ, que inducirían la producción de matriz extracelular a nivel del glomérulo (aumento en el espesor de la membrana basal glomerular y expansión del mesangio), así como la transdiferenciación epitelial-mesenquimal de las células del túbulo renal, lo que llevaría a fibrosis intersticial. Estos cambios llevan a una esclerosis de arteriolas aferentes y eferentes, lo que se traduce clínicamente en microalbuminuria. Con el tiempo hay falla de los glomérulos afectados e hipertrofia de los remanentes, observándose una macroalbuminuria (proteinuria clínica). Finalmente la glomeruloesclerosis, caracterizada por la presencia de lesiones de esclerosis/hialinosis que afecta a un porcentaje variable de glomérulos (focal) y sólo a una parte de los mismos (segmentaria), se hace generalizada llevando a insuficiencia renal terminal, con la necesidad de hemodiálisis o trasplante.

La **neuropatía diabética** tiene múltiples manifestaciones que llevan a un aumento en la morbi- mortalidad de los pacientes. Aproximadamente 60-100% de los pacientes con 20 años de duración de su Diabetes presentan algún tipo de neuropatía. Esta patología puede generar

una neuropatía diabética periférica **somática** (afecta fibras nerviosas sensitivas y motoras de gran longitud, simétrica) o **autonómica** (afecta fibras nerviosas que inervan vasos sanguíneos y vísceras).

La demielinización y degeneración axonal son las características patológicas primarias de la neuropatía diabética motora. La *biopsia del nervio sural* es la prueba *gold estándar* para la evaluación morfométrica de la neuropatía periférica. La densidad de fibras nerviosas mielinizadas correlaciona con la velocidad de conducción sensorial sural, parámetros que disminuyen progresivamente en los pacientes diabéticos. Estudios de *biopsia de piel* permiten la identificación temprana de la patología, a través de la identificación de fibras nerviosas intra-epidérmicas, asociadas con la neuropatía diabética (expresado como el número de fibras / área). La densidad de fibras correlaciona inversamente con el umbral térmico, tanto al calor como al frío, aunque los resultados son contradictorios. Actualmente se han desarrollado nuevas técnicas oftálmicas no invasivas, como la *microscopía confocal corneal*. La pérdida de fibras nerviosas de la córnea correlaciona con la pérdida de fibras nerviosas intra-epidérmicas y la severidad de la neuropatía en pacientes diabéticos. Esta técnica permite hacer un diagnóstico temprano, así como determinar el progreso y seguimiento consecutivo a un determinado tratamiento.

Complicaciones Macrovasculares

Las complicaciones macrovasculares asociadas con la Diabetes son la enfermedad arterial coronaria (EAC), enfermedad arterial periférica (EAP) y la enfermedad cerebrovascular (ECV).

La causa más importante de morbi- mortalidad de los pacientes diabéticos es la **enfermedad cardiovascular**, la cual es exacerbada en presencia de hipertensión. La hipertensión se debe a factores genéticos y modificadores ambientales de estos factores genéticos. Varios factores de riesgo se han asociado con esta complicación, como la disfunción endotelial, inflamación vascular, remodelamiento arterial, aterosclerosis, dislipemias (ver Capítulo 10) y obesidad (Cap. 7). Los individuos diabéticos presentan una aterosclerosis coronaria más severa y progresiva que la que se presenta en la población general. La EAC en pacientes diabéticos se caracteriza porque aparece más temprano que en la población no diabética, es más extensa, afecta a múltiples zonas arteriales y compromete arterias coronarias más distales y pequeñas. También, la ruptura de placas y formación de trombos es más común en los diabéticos, llevando a un peor pronóstico después del síndrome coronario agudo, *stroke* (accidente cerebrovascular) y falla cardíaca. Varios estudios han demostrado una mayor mortalidad por esta enfermedad en pacientes diabéticos, en comparación con la población general. La EAC es la causa de muerte en alrededor del 30% de los pacientes con DM1 por más de 40 años de enfermedad. Por otro lado, la mortalidad cardiovascular se ha estimado en alrededor de 2.4 veces más alta en hombres y 2.9 veces en mujeres con DM2, comparada con individuos no diabéticos.

Diferentes mecanismos conducen al daño funcional y estructural de la pared arterial, como un factor principal asociado con el desarrollo y progresión de las complicaciones macrovasculares. La hiperglucemia, vías relacionadas (Fig 6.16 y 6.17) y la resistencia a la insulina intervienen en la vasoconstricción, respuesta proinflamatoria y protrombótica vascular, que promueven eventos pro-ateroscleróticos. La aterosclerosis en la Diabetes se ve acelerada por la disfunción de las células de musculo liso vascular (CMLV) y endotelial, la activación inflamatoria e inmune, asociada con dislipemias, y resistencia insulínica.

La prevalencia de **enfermedad arterial periférica** en individuos diabéticos, está en el rango de 20-30%. La claudicación intermitente e isquemia crítica de las extremidades (con dolor en reposo isquémico crónico, úlceras y gangrenas debido a enfermedad arterial), se presenta en los pacientes diabéticos. La prevalencia de EAP aumenta con el envejecimiento, la duración de la Diabetes y otros factores de riesgo como el tabaquismo, dislipemias, hipertensión, así como el grado de descompensación metabólico. Las lesiones de EAP típicas en los diabéticos están localizadas en la arteria poplítea o en los vasos de escurrimiento distales a la rodilla, es decir las arterias tibial anterior, posterior y peroneales. Otra característica de EAP es la *calcificación* de la lámina media de la pared arterial, un proceso activo y regulado de manera similar a la mineralización del hueso y que se asocia con la presencia de placas de ateroma. El tratamiento de la EAP consiste en eliminar los factores de riesgo, eliminar el tabaquismo, optimizar el control glucémico (reduciendo la HbA1c a <7%), disminuir los niveles de LDL y reducir la presión arterial.

La **enfermedad cerebrovascular** es la causa más común a largo término de morbilidad y mortalidad en pacientes con DM1 y DM2. El accidente cerebro vascular y los ataques de isquemia transitorios se encuentran aumentados en los pacientes diabéticos. Estudios realizados en pacientes con DM1 demostraron que la presencia de nefropatía diabética es un fuerte predictor de riesgo de accidente cerebrovascular, causando un incremento de 10 veces en el riesgo. La prevención de esta situación debería estar dirigida al tratamiento de múltiples factores, como la hipertensión, hiperlipemia (tratamiento con estatinas), microalbuminuria, hiperglucemia, tabaquismo, y adecuado uso de medicación antiagregante plaquetaria (inicialmente aspirina, dipiridamol). En casos recurrentes y de alto riesgo se puede realizar una cirugía de carótida para revascularización.

Diabetes mellitus Gestacional

Según la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD), el aumento en el sobrepeso y la obesidad se acompaña de muchos casos de Diabetes o alteraciones en la glucemia no diagnosticados. Esto también ocurre en mujeres que se embarazan desconociendo su situación clínica, lo cual ha llevado a un aumento en la prevalencia de Diabetes durante el embarazo.

La **Diabetes mellitus gestacional** (DMG) se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que comienza o se detecta por primera vez durante el embarazo en curso.

La definición se aplica independientemente del empleo de insulina o modificaciones en la dieta como forma de tratamiento, o si esta condición persiste o no después del embarazo. No excluye la posibilidad de que la intolerancia a la glucosa haya estado presente antes de la gestación sin ser reconocida, o que continúe al finalizar la misma. Es importante el reconocimiento clínico de la DMG porque su tratamiento, incluyendo dieta e insulina si es necesario, y el monitoreo fetal preparto, reduce la morbi-mortalidad perinatal asociada con esta condición. El concepto de *Diabetes Pregestacional* corresponde a una mujer con diagnóstico previo de DM1, DM2 u otra forma de Diabetes que se embaraza, o a una mujer embarazada que cumple con los criterios diagnósticos generales de DM (Tabla 6.2).

Existen varios factores de riesgo para la DMG, pero los más importantes son la obesidad pre-embarazo o mayor índice de masa corporal pre-gestacional, edad en la madre > 30 años, familiares en primer grado con Diabetes, DMG en embarazos previos, o macrosomía (RN>4kg) en embarazos previos. Sin embargo, estos factores son también relevantes en el contexto de determinados grupos étnicos.

En los EEUU la DMG complica al 4% de los embarazos, la prevalencia puede extenderse entre el 1-14% de los embarazos, dependiendo de la población estudiada. En la Argentina el 65% de la población es de origen italiano o español, se ha reportado una prevalencia de 1.4-5% de todos los embarazos. En la ciudad de La Plata, la cátedra de Bioquímica Patológica realizó hace unos años un proyecto de extensión con el fin de detectar la prevalencia de DMG y su asociación o no con factores de riesgo previos. En más de 1700 gestantes estudiadas, se encontró una prevalencia de alrededor del 7% para embarazadas con factores de riesgo, y del 4% sin factores de riesgo. Este trabajo llevó a la recomendación (Provincial y Nacional) de que el *screening* de DMG debe ser universal, es decir hacerse a todas las embarazadas, independientemente de que tengan o no factores de riesgo para DMG. Es decir, todas las embarazadas sin hiperglucemia en ayunas deben realizarse una Prueba de tolerancia oral a la glucosa a las 24-28 semanas de gestación, a fin de reducir las complicaciones perinatales asociadas con DMG.

Fisiología

Durante el embarazo, especialmente en el 3er trimestre, se desarrolla fisiológicamente un estado de insulino-resistencia materno. Cuando a esta situación fisiológica se sobre-agrega una condición pregestacional de déficit en la secreción de insulina y/o de resistencia a esta hormona (por ejemplo, una mujer con uno o más de los factores de riesgo indicados en la Tabla 6.6), puede desencadenarse una DMG.

Normalmente en el primer trimestre de embarazo se desarrolla hiperplasia e hipertrofia de las células beta pancreáticas debido al aumento en los niveles circulantes de estrógenos y la progesterona. El aumento en la secreción de insulina genera un aumento en la masa del tejido adiposo que progresivamente, con el avance del embarazo se va haciendo resistente, generándose un estado de resistencia insulínica periférica alrededor de las 20-24 semanas de gestación.

Esta resistencia se asocia con los niveles de hormonas generadas por los adipocitos o adipocinas (leptina, resistina, visfatina, adiponectina) y por la placenta (Prolactina, Hormona de crecimiento placentaria, lactógeno placentario, progesterona y estrógenos), así como otras hormonas del estrés (glucocorticoides). En respuesta a esta resistencia insulínica, las células beta aumentan la secreción de insulina (2-3 veces), tratando de compensar la resistencia periférica. A medida que progresa el embarazo y asociado con la resistencia a la insulina, se observa un aumento en los niveles de glucosa, ácidos grasos, aminoácidos y otros nutrientes (disponibles así para la unidad feto-placentaria).

La glucosa de la madre atraviesa la placenta a fin de satisfacer los requerimientos del feto. A medida que el feto se desarrolla, consume los nutrientes de la madre, en forma independiente de la ingesta materna. Así, los nutrientes son aclarados de la circulación materna en una forma dependiente de la concentración, y son empleados para el desarrollo y crecimiento estructural del feto y para necesidades oxidativas. Habrá una caída importante y rápida en los niveles de glucosa y aminoácidos sanguíneos maternos, con activación de la gluconeogenesis. La reducción en la glucosa sanguínea puede progresar a una **hipoglucemia franca**. Esta hipoglucemia de ayuno se ha considerado como un *síndrome de deficiencia de sustratos*. También pueden detectarse alteraciones metabólicas en el estado alimentado. La ingestión de glucosa después de un ayuno de toda la noche, produce un aumento más prolongado en los niveles de glucemia, un mayor incremento en VLDL y mayor caída en el glucagon plasmático. Esta secuencia de eventos se ha denominado *anabolismo acelerado*.

En resumen, las oscilaciones entre el estado ayunado y alimentado de la madres son de mayor amplitud que antes del embarazo. Así, hay una adaptación entre la madre, alimentándose en forma intermitente y el feto, que se alimenta en forma continua y de alguna manera regulado independientemente. Por estas razones deben establecerse estándares separados para evaluar la tolerancia a la glucosa y para monitorear la calidad del manejo de la Diabetes en el embarazo.

Significado clínico de DMG

El desarrollo de DMG clasifica al embarazo como de “alto riesgo”, lo cual implica un control obstétrico más intenso. La falta de un control adecuado en el curso de la DMG pone en riesgo el desarrollo fetal, con posibles consecuencias de riesgo obstétrico y neonatal. Los hijos de madres con DMG presentan un mayor riesgo de morbi-mortalidad por macrosomía fetal, traumas al nacimiento y cesárea de urgencia (asociado con hipoglucemia, hipocalcemia, policitemia e hiperbilirrubinemia). La DMG también puede implicar importantes consecuencias a largo término para el niño (desarrollo de obesidad y/o DM2) y para la madre (DM permanente luego del parto o de tener otro embarazo con DMG).

Una de las complicaciones frecuentes es el nacimiento de neonatos **macrosómicos** (>4Kg), con un crecimiento “asimétrico”. Esta situación puede explicarse por el efecto de la “hiperglucemia-hiperinsulinemia” fetal. La alta concentración de glucosa (igual que de otros nutrientes) de la

madre atraviesa la placenta (no así la insulina materna) y va servir como combustible para el crecimiento fetal. A nivel del páncreas fetal, las células beta responden a la hiperglucemia liberando insulina a su circulación. Esta hormona, actúa a nivel de los tejidos fetales como un “factor de crecimiento” (junto con otros factores de crecimiento como IGF-I) y regulador anabólico, con mayor efecto sobre los tejidos “blanco” que presentan mayor sensibilidad a la insulina: tejido adiposo y muscular. Lo más característico de la “*macrosomía diabética*” es un incremento asimétrico de crecimiento en el cual el peso (como un indicador de adiposidad) podría ser más afectado que el diámetro biparietal (como un índice de desarrollo encefálico) o la altura (como un índice de maduración esquelética). El aumento en la adiposidad se manifiesta por un aumento en la acumulación de grasa en los hombros, hígado, corazón (agrandado). En particular, la adiposidad en los hombros contribuye al riesgo de partos traumáticos, aumenta la probabilidad de *distosis* de los hombros, parto lento y dificultoso, trauma al nacimiento y cesárea de urgencia. Aunque el crecimiento esquelético puede ser menos dependiente de insulina, también se encuentra un modesto incremento en la altura (longitud) del feto. La cabeza parece ser desproporcionadamente pequeña debido a que el tamaño del encéfalo es adecuado a la edad gestacional.

Otra situación diferente puede ocurrir como una complicación materna de la Diabetes, lo contrario de la macrosomía, el **retardo de crecimiento intrauterino**. Esto se ha atribuido al desarrollo de una enfermedad vascular materna causando insuficiencia útero-placentaria. El riesgo parece ser mayor en mujeres con Diabetes de larga data. Recientemente se ha sugerido que algo del retardo de crecimiento puede deberse a alteraciones en los nutrientes maternos durante las etapas tempranas del embarazo, especialmente durante el periodo de organogénesis.

Complicaciones de la DMG descompensada

La aparición de DMG durante el embarazo, su falta de diagnóstico y/o de tratamiento pueden tener serias consecuencias para la madre y el feto.

En el caso de la madre, hay alto riesgo de **morbilidad perinatal materna**, debido al desarrollo de pre-eclampsia y/o a la necesidad de una cesárea de urgencia.

En el caso del bebe, el incremento en la **morbi-mortalidad perinatal infantil** se asocia con macrosomía, hipoglucemia neonatal, *distress* respiratorio por inmadurez pulmonar, hipocalcemia e hipomagnesemia, ictericia neonatal por inmadurez hepática, policitemia con hiperviscosidad. La mortalidad perinatal neonatal es de hasta un 15% en el caso de una DMG no tratada, en comparación con un 0,5% en caso de una DMG adecuadamente tratada. Aunque no se sabe la causa, en casos extremos puede haber muerte intrauterina, y ello se asocia con la descompensación metabólica materna. El *distress* respiratorio se ha asociado con alteraciones en la maduración del pulmón fetal, lo cual se puede evaluar a través de medidas de fosfolípidos en líquido amniótico. Se puede desarrollar hipocalcemia e hipomagnesemia al nacimiento. Se ha reportado que la secreción de PTH esta alterada en niños de madres diabéticas. La hipomagnesemia limita la producción de PTH y se genera en la madre diabética por excesiva perdida renal asociada con

la glucosuria. Esto a su vez causa hipomagnesemia fetal y neonatal. Los niños de madres diabéticas están en riesgo de desarrollar policitemia e hiperviscosidad, debida a varios factores: aumentada hematopoyesis en la vida fetal, probablemente por un aumento en la producción de eritropoyetina debida a la hipoxia intrauterina. La hiperbilirrubinemia puede ocurrir en niños de madres diabéticas debido a: (1) incremento del catabolismo de la hemoglobina, por el aumento en la masa de glóbulos rojos en caso de policitemia; y/o (2) por inmadurez hepática.

Aproximadamente 20-25% de los hijos de madres con DMG experimentan **hipoglucemia neonatal**, usualmente durante las primeras 4-6 horas de vida extrauterina. El nivel de hiperinsulinemia fetal pre-parto (a su vez dependiente del grado de hiperglucemia materna) juega un rol preponderante en esta hipoglucemia neonatal. En el posparto inmediato, desaparece el aporte exógeno hiperglucémico pero persiste la hiperinsulinemia (hasta su aclaramiento de la circulación fetal). Además, los islotes del niño de madre diabética son hiperplásicos e hiperfuncionantes, y responden a una carga de glucosa externa con una gran secreción de insulina. La hiperinsulinemia limita la producción de glucosa hepática y aumenta la captación de glucosa por los tejidos periféricos. La gluconeogenesis también puede estar comprometida por inhibición preparto de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Las manifestaciones clínicas de la hipoglucemia neonatal son variables. Los niños hipoglucémicos pueden permanecer asintomáticos o presentar temblores, sudorosos o cianóticos. Pueden aparecer convulsiones e hipoglucemia profunda que causan daño cerebral. Si la hipoglucemia es prolongada, puede haber disminuida contractilidad miocárdica y falla cardíaca congestiva. Por esto todos los niños de madres diabéticas deben ser controlados en cuanto a su glucemia durante las primeras 24 horas posparto.

Detección de DMG

La DMG es casi siempre asintomática (sin hiperglucemia en ayunas en el 80% de los casos) y, como se ha indicado más arriba, la ausencia de “factores de riesgo” no excluye adecuadamente la presencia de DMG. Por ello, la pesquisa mediante una PTOG debe realizarse en todas las embarazadas sin hiperglucemia en ayunas, entre la semana 24 y 28 de gestación. Los factores de riesgo asociados a DMG se enumeran en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6. Factores de riesgo asociados con DMG

• Edad materna \geq 30 años
• Antecedentes de Diabetes en familiares en 1er grado
• Obesidad (Índice de masa corporal $>$ 27 Kg/m ²)
• GPA $>$ 85 mg/dL
• Antecedentes de DMG en embarazos previos
• Antecedentes de hijos macrosómicos ($>$ 4Kg al nacer)

• Antecedentes de TGA o insulino resistencia materna
• Antecedentes de abortos espontáneos
• Antecedentes de bajo peso (<10° percentilo) o alto peso (>90° percentilo) del bebe al nacimiento
• Antecedentes de hipertensión en embarazos previos
• Mortalidad perinatal previa
• Origen étnico asociado con alto riesgo de Obesidad o DM

Se sugiere realizar una determinación de GPA en la primera visita al obstetra, aunque esta prueba sólo detecta al 10-20% de los casos. El dosaje de HbA1c no provee una medida aceptable y sensible para el diagnóstico, por lo que no se la recomienda como prueba diagnóstica. Se puede hacer una prueba de tamizaje a las 24-28 semanas de gestación, con una carga oral de glucosa de 50g y sin tener en cuenta el momento del día o de la última comida y se determina la glucemia a la hora. Si este valor supera los 140mg/dL, se realiza un PTOG diagnóstica, igual que la descrita para DM. Sin embargo, en nuestro medio no se recomienda comenzar con la prueba de tamizaje, sino realizar directamente una PTOG diagnóstica.

Los valores de corte diagnósticos son menores que para las pacientes no embarazadas, y esto se debe a los cambios metabólicos que normalmente sufre la mujer durante el embarazo (como se explicó en párrafos anteriores) (Tabla 6.7).

Tabla 6.7. Detección de DMG

<i>Prueba</i>	<i>Valores de Corte</i>
GPA	➤ 100 - 125 mg/dL (confirmar a la semana)
PTOG (50g glucosa) (no en ayunas)	➤ >140 mg/dL a la hora (confirmar)
PTOG (75g glucosa) (en ayunas)	➤ \geq 140 mg/dL a las 2 horas (prueba diagnóstica)

Actualmente la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) recomienda seguir el algoritmo para el diagnóstico de DMG que se indica en la Fig. 6.18.

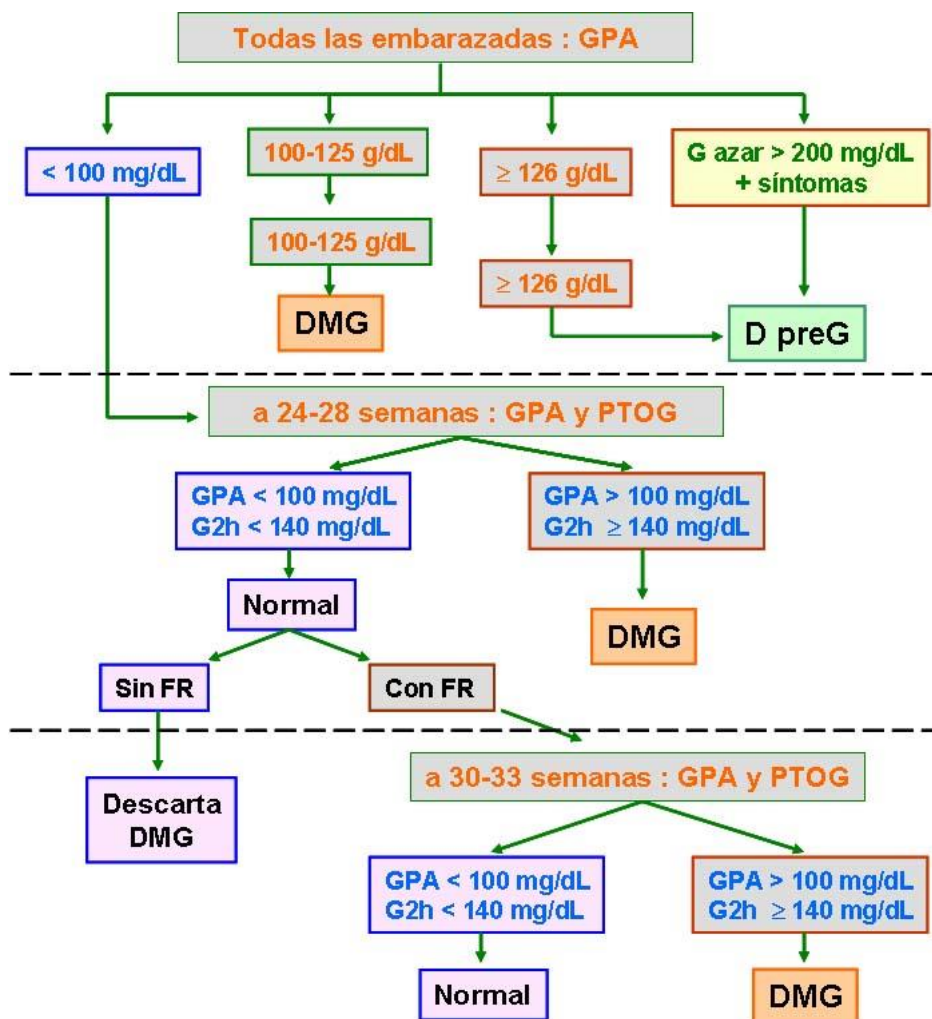


Figura 6.18. Algoritmo para la detección de Diabetes mellitus gestacional. GPA, glucosa plasmática en ayunas; G azar, glucemia al azar; G2h, glucemia a las 2h post carga de 75g glucosa oral; PTOG, prueba de tolerancia a la glucosa; FR, factores de riesgo; D preG, Diabetes pre-gestacional

Control y Seguimiento

La forma de control en DMG es el monitoreo de la GPA, lo que permite tomar decisiones terapéuticas rápidas. Los objetivos son los que aparecen en la Fig. 16.19.

Glucemia en ayunas: 70 - 90 mg/dL
 Glucemia pre-prandial: 70 - 105 mg/dL
 Glucemia 2h post-prandial: 90 - 120 mg/dL
 Cetonuria negativa
 Evitar las hipoglucemias
 Fructosamina y Hb glicosilada: límites normales

Figura 6.19.

La ganancia de peso durante el embarazo dependerá del estado nutricional previo, evaluado a través del IMC (Tabla 6.8).

Tabla 6.8

<i>Estado nutricional previo (IMC)</i>	<i>Ganancia de peso en embarazo recomendada para DMG (Kg)</i>
Bajo peso < 18.5	12.5 - 18
Peso normal 18.5 - 24.9	11 - 16
Sobrepeso 25 - 29.9	7.0 - 11
Obesidad \geq 30	5.0 – 7.0

Debe evaluarse la cetosis en ayunas, y en caso de ser positiva, reajustar el plan de alimentación. Episodios de hipoglucemia pueden ocurrir y muchas veces ser asintomáticos para la madre; sin embargo esto puede tener consecuencias para el desarrollo del feto. Por ej., se observó que los fetos pequeños para la edad gestacional aumentaron cuando la GPA era inferior a 87 mg/dL. La evaluación de HbA1c y Fructosamina pueden usarse como parámetros de seguimiento en el control metabólico durante el embarazo, aunque su uso es aun discutido.

Tratamiento

Un tratamiento no farmacológico basado en **Educación diabetológica** y un **plan de Alimentación** son fundamentales para alcanzar los objetivos del control glucémico. También, la **actividad física** resulta útil en el control metabólico en las embarazadas con DMG.

Si con la dieta y ejercicio no se obtienen los resultados esperados, se debe iniciar un **tratamiento farmacológico** a fin de controlar la glucemia. Para esto se usa como primera línea de intervención, insulina. Se puede usar la insulina humana NPH (*neutral protamine Hagedorn*), aprobada por la FDA, así como el análogo detemir, los que se asocian con menor riesgo de hipoglucemias. También es posible y se ha aprobado el uso de insulinas rápidas o ultra rápidas, insulina regular humana y el análogo de insulina aspártica. Otros análogos no han sido aprobados por no existir estudios adecuados que garanticen la falta de efectos sobre el desarrollo fetal o riesgo para la madre. Respecto a los antidiabéticos orales, como la metformina y glibenclamida, se sabe que atraviesan la placenta y al no existir estudios sobre su seguridad a largo plazo, no son recomendados.

Referencias

- American Diabetes Association (ADA): Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34(S1):S62–69.
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615-25.
- Cersosimo E, Solis-Herrera C, Trautmann ME, Malloy J, Triplitt CL. Assessment of pancreatic β -cell function: review of methods and clinical applications. *Curr Diabetes Rev*. 2014 Jan;10(1):2-42. Review.
- DeFronzo RA, Ferrannini E, Zimmet P, George Alberti (2015). *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Wiley-Blackwell.
- García García C. Diabetes mellitus gestacional. *Med Int Mex* 2008;24(2):148-56.
- Guía de diagnóstico y tratamiento de Diabetes gestacional. ALAD2016. *Rev ALAD* 2016, 6, 155-169.
- McCarthy AD, Curciarello R, Castiglione N, Tayeldín MF, Costa D, Arnol V, Prospitti A, Aliano A, Archuby D, Graieb A, Torres MJ, Etcheverry SB, Apezteguía MC. Universal versus selective screening for the detection, control and prognosis of gestational Diabetes mellitus in Argentina. *Acta Diabetol*. 2010 Jun;47(2):97-103
- Organización Mundial de la Salud (2016). Informe mundial sobre la Diabetes: Resumen de orientación.
- Ruiz M (Ed). *Diabetes mellitus*. 4ed. Buenos Aires. Akadia, 2011.
- Taylor SI. Diabetes mellitus. Cap 21. En Charles R. Scriver, Arthur L. Beaudet, William S. Sly, David Valle. *Seven Ed*. 1995.
- Wiseman A (Series Editor) (1989). *Understanding insulin action. Principles and Molecular action*. J Espinal. Ellis Horwood series in biochemistry and biotechnology.
- Zheng J, Cheng J, Zhang Q, Xiao X. Novel insights into DNA methylation and its critical implications in diabetic vascular complications. *Biosci Rep*. 2017 Mar 15;37(2).

CAPÍTULO 7

Síndrome Metabólico

Antonio D. McCarthy y Ana María Cortizo

Introducción

Uno de los grandes problemas que enfrentan las sociedades industrializadas son los desórdenes nutricionales, que frecuentemente se asocian con sobrepeso. El estado nutricional de un individuo depende de múltiples factores (genéticos, epigenéticos, género, entorno, actividad física y la presencia de determinadas condiciones patofisiológicas). El síndrome metabólico (SM), también llamado síndrome de resistencia a la insulina, síndrome X o síndrome de Reaven, fue propuesto como entidad por Reaven en 1988. Se lo define como la coexistencia en un mismo individuo de varios factores de riesgo cardiovascular. No constituye una enfermedad en sí misma, sino que es un conjunto de factores de riesgo cardiovascular que se agrupan con mayor frecuencia en la población general (25% de sociedades occidentales) de lo que podría esperarse sólo por azar. Se ha encontrado que la probabilidad de que ocurra un evento cardiovascular se potencia cuando coexisten varios factores de riesgo en una misma persona, es decir que es mayor que la suma del riesgo de los componentes individuales.

Los componentes asociados con el SM incluyen obesidad central, hipertensión, dislipemia (hipertrigliceridemia y bajo HDL-colesterol) e intolerancia a la glucosa o resistencia insulínica periférica. Puede también coexistir un estado protrombótico y proinflamatorio (Tabla 7.1). En 1988, Reaven en su presentación para la Banting Lecture de la American Diabetes Association, acuñó el término “síndrome X”, haciendo referencia a la relación entre la insulino resistencia, la captación de glucosa estimulada por insulina, la hipertensión, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedad cardiovascular. La Federación Internacional de Diabetes (IDF, international diabetes federation) define un síndrome como “un complejo reconocible de síntomas y descubrimientos físicos y bioquímicos para los que no se conoce una causa directa en el que los componentes coexisten con más frecuencia que los que podría esperarse solo por chance. Cuando los mecanismos causales se identifican, el síndrome se transforma en enfermedad”.

Tabla 7.1. Componentes de riesgo cardiovascular asociados con el SM

1	Obesidad (generalizada y especialmente central)
2	Resistencia a la Insulina
3	Hiperinsulinemia
4	Dislipemia (↑TG, ↓HDL, LDL pequeña densa)
5	Almacenaje disfuncional de TG (adipocitos viscerales y periféricos hipertróficos)
6	Tolerancia a la glucosa alterada o DM2
7	Hígado graso (esteatohepatosis no alcohólica, esteatohepatitis)
8	Hipertensión (↑ presión sistólica y/o diastólica)
9	Disfunción endotelial
10	Disfunción renal (micro- o macro-albuminuria)
11	Síndrome de ovario poliquístico
12	Inflamación de bajo grado (↑ PCR y otros marcadores inflamatorios como IL-1)
13	Hipercoagulabilidad (↑ fibrinógeno y PAI-1)
14	Arterioesclerosis que conduce a ↑ morbilidad y mortalidad cardiovascular

Adaptado de Miranda et al., Am Heart J 2005;149:33-45.

Definición

La primera definición formal del SM fue propuesta en 1998 por la Organización Mundial de la Salud (*WHO, World Health Organization*), basada en la presencia de insulino resistencia (hiperinsulinemia), tolerancia a la glucosa alterada (TGA), o diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 2. Además debían presentarse dos de las siguientes condiciones: dislipemia (bajo HDL-colesterol y/o aumento de TG), hipertensión y microalbuminuria (Tabla 7.1). La primera definición formal del SM fue propuesta en 1998 por la Organización Mundial de la Salud (*WHO, World Health Organization*), basada en la presencia de insulino resistencia (hiperinsulinemia), tolerancia a la glucosa alterada (TGA), o diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 2. Además debían presentarse dos de las siguientes condiciones: dislipemia (bajo HDL-colesterol y/o aumento de TG), hipertensión y microalbuminuria (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Criterios para el diagnóstico de SM

	WHO (1998)	NCEP-ATP III (2001)	AACE (2003)	IDF (2005)	Declaración conjunta (2009)
Definición	TGA, GPA, DM2, o resistencia insulínica + 2 criterios de abajo:	3 de los 5 criterios de abajo:	TGA o GPA + cualquiera de los siguientes basado en juicio clínicos	Obesidad central + 2 de los criterios de abajo:	3 de los 5 criterios de abajo:
Glucosa	TGA, GPA, o DM2	GPAy > 110 mg/dL (incluye diabetes)	TGA o GPA (pero no diabetes)	GPAy 100 mg/dL (incluye diabetes)	GPAy 100 mg/dL) o on drug Rx
Peso corporal	h: RCC>0.9, m: >0.85 y/o IMC>30 kg/m ²	h: cc 102 cm, m: cc 88 cm	IMC 25 kg/m ²	Aumento en CC (específico de etnia)	Aumento en CC (específico de población y país)
Lípidos	TG 150 mg/dL y/o HDL-C < 35 mg/dL (h) o <39 mg/dL (m)	TG 150 mg/dL; HDL-C < 40 mg/dL (h) o <50 mg/dL (m)	TG 150 mg/dL; HDL-C < 40 mg/dL (h) o <50 mg/dL (m)	TG 150 mg/dL; HDL-C < 40 mg/dL (h) o <50 mg/dL (m) o en tratamiento	TG 150 mg/dL; HDL-C < 40 mg/dL (h) o <50 mg/dL (m) o en tratamiento
Presión sanguínea	160/90 mmHg	130/85 mmHg	130/85 mmHg	130/85 mmHg o en tratamiento	130/85 mmHg o en tratamiento
Otros	Micro-albuminuria: velocidad de excreción urinaria >20 mcg/min o relación albumina : creatinina >20 mg/g		Otras características de Insulino Resistencia		

Insulino resistencia: medida bajo condiciones de clamp euglicémico hiperinsulinémico; WHO, Organización Mundial de la Salud; NCEP-ATP, Programa de Educación Nacional de Colesterol-Panel de Tratamiento en Adultos; AACE, Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos; IDF, Federación Internacional de Diabetes; TGA, Tolerancia a la glucosa alterada; GPA, Glucosa plasmática alterada; DM2 Diabetes mellitus tipo 2; GPAy glucosa plasmática en ayunas; RCC, Relación cintura cadera; IMC, Índice de masa corporal; h, hombre; m, mujer; cc, circunferencia de cintura. En tratamiento se refiere a tratamiento farmacológico acorde a la condición.

En 2001, el NCEP-ATP publicó una serie de criterios basados en medidas clínicas comunes: circunferencia de cintura (CC), presión sanguínea, lípidos y glucosa plasmática. En este caso la

diferencia de criterios es que no se requiere la evaluación de resistencia insulínica. Desde entonces otros grupos de trabajo han hecho propuestas para definir la relación entre enfermedad cardiovascular y metabólica (Tabla 7.1). En particular, la IDF destacó la existencia de dificultades para aplicar los criterios diagnósticos en todo tipo de poblaciones, por ej para el IMC (índice de masa corporal) o la CC. Finalmente, en 2009 se establecieron criterios consensuados por las diferentes asociaciones. A través de este último se estableció que un individuo tiene SM si reúne tres de los 5 requisitos siguientes:

1. **Obesidad abdominal.** Definida a través de la CC.
hombres 94 cm (Europeos) o 90 cm (Sudamérica)
mujeres 80 cm (ambas zonas).
2. **TG plasmáticos** 150 mg/dL (1,7 mmol/L) o en tratamiento farmacológico.
3. **HDL-colesterol**
hombres < 40 mg/dL (1,1 mmol/L)
mujeres < 50 mg/dL (1,3 mmol/L)
o en tratamiento farmacológico.
4. **Presión arterial** sistólica 130 mmHg y/o diastólica 85 mmHg
o tratamiento antihipertensivo.
5. **Glucemia** 100 mg/dL (5,6 mmol/L) o en tratamiento con hipoglucemiantes.

El SM es una condición de alta prevalencia en el mundo, y actualmente se halla en aumento. Sin embargo, la prevalencia exacta depende de la definición que se adopte para el síndrome. En nuestro país se realizó un estudio de prevalencia de SM en aproximadamente 2800 trabajadores de 40-65 años de diferentes regiones (regiones Centro, NOA, NEA, Cuyo y Patagonia) en 2005. Se encontró una prevalencia de 25,6 a 34,9 % según los diferentes criterios, siendo a su vez mayor en hombres que en mujeres. Recientemente, se reportó un meta-análisis sobre la prevalencia de SM en Argentina, basado en publicaciones entre 1989-2014, usando tres criterios diferentes (WHO, NCEP-ATP III o IDF). La prevalencia encontrada fue de 27%, siendo más alta en hombre que en mujeres (29.4% vs. 27.4%). Es posible modificar esta prevalencia mediante intervenciones (por ej., cambios en el estilo de vida, o el tratamiento farmacológico con hipolipemiantes, antihipertensivos y/o metformina, un insulino-sensibilizante oral), lo cual es esperable que a su vez reduzca el riesgo de eventos cardiovasculares y de DM2.

Patofisiología

Coincidiendo con la definición de síndrome, no se conoce una causa etiológica específica asociada con el SM. No obstante, la resistencia insulínica y la adiposidad parecen ser determinantes centrales en la patofisiología de esta condición.

Se han identificado genes de susceptibilidad para el SM, a través de estudios de asociación de genoma amplio. Por ejemplo, genes relacionados con la capacidad de la célula beta pancreática para compensar la insulino-resistencia, lo cual podría predecir el riesgo de desarrollar un estado prediabético y finalmente Diabetes mellitus. Más allá de las alteraciones en la función de la célula beta, existen factores genéticos y epigenéticos que interactúan con factores del entorno y la dieta, para influenciar el desarrollo del SM.

Obesidad

Según la OMS, la obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de TG en tejido adiposo blanco, que puede ser perjudicial para la salud. La etiología de esta condición incluye una interacción compleja de factores genéticos/epigenéticos, dieta, factores metabólicos y actividad física, incluyendo un componente inflamatorio.

Normalmente, durante la formación del tejido adiposo blanco los preadipocitos se diferencian a adipocitos uniloculares, cambian su morfología y aumenta la acumulación intracelular de triglicéridos. Sin embargo, durante el desarrollo de la obesidad, se produce una hipertrofia de adipocitos con infiltración de macrófagos secretores de inhibidor del activador del plasminogeno de tipo 1 (PAI-1) e interleuquina 6 (IL-6). Adicionalmente, los adipocitos secretan diferentes productos de acción local y/o sistémica, como ácidos grasos libres (AGL), prostaglandinas, citoquinas inflamatorias o adipoquinas. Estos factores pueden favorecer cambios patológicos en diferentes órganos, tales como hígado graso, alteraciones vasculares que conducen a la progresión de la aterosclerosis y aumento del riesgo cardiovascular. Por otro lado, los AGL que son tomados por el hígado se transforman en TG que aumentan la formación de VLDL, asociándose esto con el hipertrigliceridemia del SM.

Dentro de las adipoquinas, la leptina correlaciona con el IMC y la adiposidad. Esta hormona actúa a través de la unión a receptores ObR localizados en el hipotálamo y en células endoteliales. A nivel hipotalámico, esta unión disminuye el apetito y aumenta el gasto energético. Muchos pacientes obesos son hiperfágicos, a pesar de tener elevados niveles de leptina, lo cual sugiere un estado de resistencia a la leptina asociado con disminución en los receptores ObR del hipotálamo, o alteraciones post-receptor. Esta situación se ha asociado con resistencia a la insulina y obesidad abdominal, también componentes del SM.

Otra citoquina del tejido adiposo es la adiponectina, que existe en forma de trímeros, hexámeros y multímeros (50% circulante). Esta adipoquina actúa a través de su receptor AdipoR1 en el musculo esquelético y AdipoR2 en el hígado. Aumenta la sensibilidad a la acción de la insulina en ambos tejidos, inhibiendo la gluconeogénesis hepática y estimulando la captación de glucosa en el músculo. Posee también efectos anti-inflamatorios y anti-aterogénicos. La obesidad se asocia con una disminución en los niveles circulantes de adiponectina, resistencia a la insulina, aumento en la gluconeogénesis y aumento en componentes inflamatorios.

Resistencia a la Insulina (RI)

Como se estableció en el Capítulo 6, podemos definir la RI como una disminución en la respuesta biológica frente a una determinada concentración de insulina. La RI puede darse tanto en personas con sobrepeso (IMC entre 25 y 30) como en personas con obesidad (IMC > 30).

La RI depende de múltiples factores: genéticos, epigenéticos, estilo de vida, alimentación y componentes inflamatorios. Se genera como un desbalance entre la capacidad secretora de insulina de las células beta pancreática y la falta de respuesta de los tejidos periféricos a la acción de la hormona, que finalmente lleva a hiperglucemia. Esta hiperglucemia representa un estímulo para las células beta que secretan mayor cantidad de insulina luego de una comida (post-prandial). Finalmente esta situación llevara al agotamiento de las células beta, alteraciones en las vías de señalización de la insulina, dislipemia debido al alto flujo de AGL, disfunción vascular y aterogénesis asociado con el SM.

También hemos discutido en el Cap 6, el efecto de elevados AGL sobre la señalización y metabolismo de glucosa en el musculo y otros tejidos. En el hígado, hay un aumento en la gluconeogénesis, que genera mayor producción de glucosa y contribuye a la hiperglucemia.

Hipertensión

Esta condición es multifactorial. Es parcialmente mediada por (a) la disfunción endotelial que generan los altos niveles de AGL y por la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS); (b) la activación de la división simpática del sistema nervioso autónomo, inducida por la hiperinsulinemia e inhibición de NOS (óxido nítrico sintasa); y (c) por los efectos de citoquinas proinflamatorias derivadas del tejido adiposo. Por otro lado, el aumento en la adiposidad genera un incremento en la conversión de angiotensinógeno a nivel del tejido adiposo (dado que los adipocitos incrementan su expresión de la enzima convertidora de angiotensina), dando lugar a un potencial mecanismo de aumento en la presión sanguínea. Los adipocitos también producen catepsinas, que tienen efectos sobre el manejo renal de electrolitos.

Hiperglucemia

Una hiperglucemia moderada, incluso por debajo de los niveles diabéticos, puede causar una serie de alteraciones y efectos citotóxicos que conducen a la aterogénesis. Por ej., la formación de productos de glicación avanzados, como vimos en el Cap. 6, afectan el metabolismo y degradación de proteínas de vida media larga como las proteínas de matriz extracelular. Pero también generan estrés oxidativo, de tal manera que la glicoxidación podría alterar las lipoproteínas de baja densidad (LDL modificadas), lo cual finalmente tendrán efectos aterogénicos.

La Fig. 7.1 resume los mecanismos propuestos para el conjunto de factores de riesgo cardiovascular asociados con el desarrollo del SM.

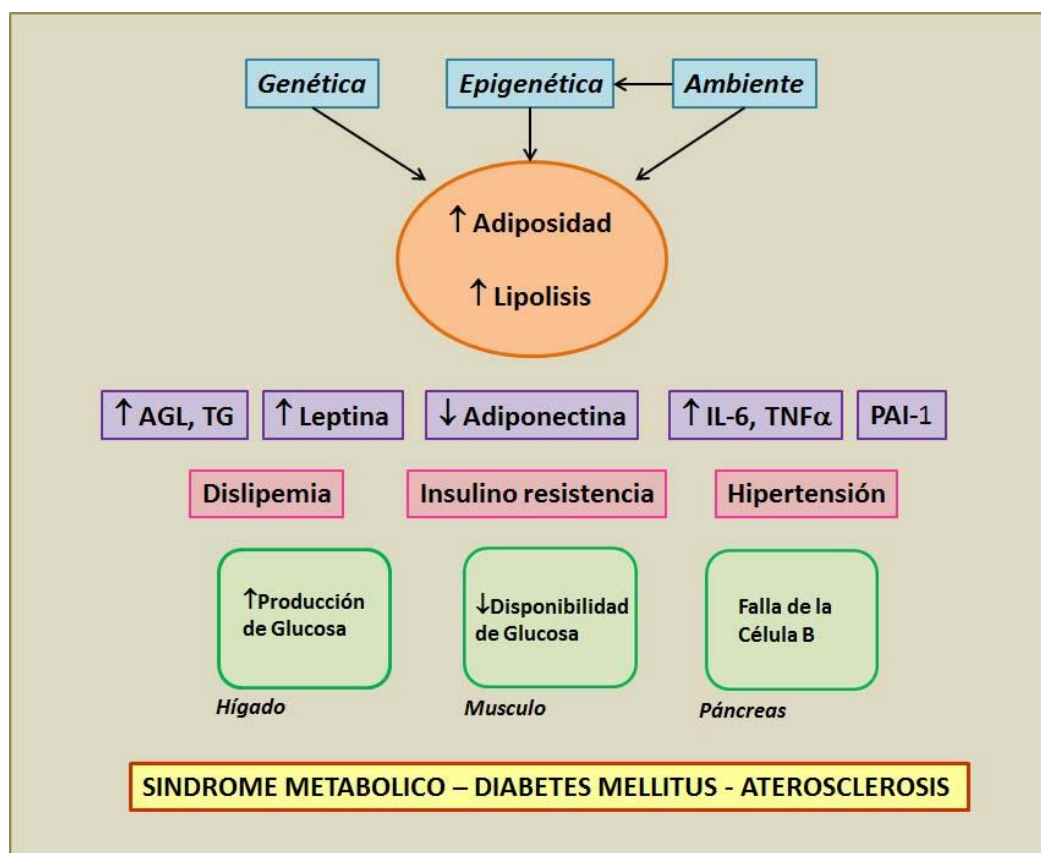


Figura 7.1. Mecanismos propuestos para el conjunto de características del SM y riesgo aterogénico

Tratamiento

El tratamiento de los pacientes con SM intenta disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular y desarrollo de DM. La obesidad es el principal foco de control en el SM, buscando una reducción del peso corporal a través de un régimen dietario y el aumento de la actividad física. La pérdida de peso disminuye el LDL-C y los triglicéridos, aumenta el HDL-C, disminuye la presión arterial, el PAI-1, la glucemia y la resistencia a la insulina. Se observa también disminución de marcadores de inflamación como IL-6, TNF α , moléculas de adhesión como VCAM. Además se ha observado que la reducción de peso restaura los niveles normales de leptina y otras adipoquinas. Globalmente, todas estas modificaciones se asocian con una disminución en el riesgo cardiovascular.

Existen individuos en los cuales la predisposición genética para el desarrollo de SM y/o DM es tan fuerte, que para prevenir o retardar estas condiciones no alcanza con cambios en el estilo de vida. En estos casos se hace necesaria una intervención farmacológica con el objetivo de

reducir la resistencia insulina y evitar el agotamiento de la célula beta pancreática. En estos casos, el fármaco de elección es la metformina, una biguanida euglucemiante que actúa principalmente a través de la regulación de AMPK hepática.

En otros casos, es necesario abordar una intervención terapéutica destinada a controlar la dislipemia aterogénica. Las estatinas (inhibidores de HMGCoAR) se usan como monoterapia o en combinación con inhibidores de la absorción de colesterol o un quelante de ácidos biliares para disminuir el LDL-C.

En individuos hipertensos con obesidad abdominal, la administración de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensinógeno disminuye la presión sanguínea y mejora la capacidad de la insulina para bajar los niveles de AGL.

En conclusión, el reconocimiento clínico de los diferentes componentes del SM permitirá la intervención a través de modificaciones en el estilo de vida y tratamientos farmacológicos adecuados, para así reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Referencias

- Coniglio RI; Nellem J; Gentili R; Sibechi N, Agusti EM; Campodonico M, Cornelio C y Torres M en representación del Estudio IFRALAC Síndrome metabólico y riesgo global para la aterosclerosis coronaria en trabajadores de 40 a 65 años de la república argentina – Estudio IFRALAC-0001. 8° Congreso Nacional Bioquímico. San Juan, 13 de agosto de 2005.
- Cornier MA1, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH. The metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2008 Dec;29(7):777-822.
- Diaz A, Espeche W, March C, Flores R, Parodi R, Genesio MA, Sabio R, Poppe S. Prevalence of metabolic syndrome in Argentina in the last 25 years: systematic review of population observational studies. *Hipertens Riesgo Vasc.* 2018 Apr - Jun;35(2):64-69.
- Hernandez AG. Principios de Bioquímica Clínica y Patología molecular. 2da Edición, Elsevier.
- Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J* 2005;149:33-45.
- Samson SL and Garber AJ. Metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin N Am* 43 (2014) 1–23.

CAPÍTULO 8

Galactosemias

Sara R. Chuguransky

Introducción

La galactosemia es un error congénito del metabolismo de carbohidratos, causado por una alteración en alguna de las tres enzimas involucradas en el metabolismo de la galactosa. Estos defectos son: deficiencia de galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (Gal-T) que da lugar a galactosemia clásica, deficiencia de galactoquinasa (GK o Gal-K) o deficiencia de UDP-galactosa-4-epimerasa (Gal-E).

Debido a la deficiencia en estas enzimas, se produce un aumento en los niveles de galactosa y galactosa-1P en sangre y según la enzima deficitaria, el metabolito que estará aumentado. Se genera fallo multiorgánico, retraso mental y puede llegar a la muerte en los primeros días de vida si no es detectada a tiempo. El tratamiento es efectivo si se instaura precozmente. Los síntomas se manifiestan a la semana o 10 días de nacimiento, por eso es importante realizar la prueba de pesquisa neonatal, para poder realizar diagnóstico y tratamiento precozmente.

Es una patología autosómica recesiva y tiene una frecuencia de 1:40000-1:60000 en Europa y EEUU.

Metabolismo normal de galactosa

La galactosa se obtiene principalmente de la leche y otros lácteos (quesos, yogur y derivados), a partir de lactosa. También está presente como galactosa libre o ligada con enlaces beta en ciertas legumbres, verduras y frutas, como galactósidos ligadas con enlaces alfa en polisacáridos de origen vegetal y en forma de galactocerebrósidos y gangliosidos en algunas vísceras de animales. El 80% se utiliza como fuente de energía y el 20% para galactosilar moléculas (modificación postraduccional necesaria para el correcto funcionamiento de las proteínas y hormonas como también para la estabilidad de membranas). Habitualmente, la fuente más importante de galactosa es la lactosa de la leche, que al llegar al intestino se hidroliza a galactosa y glucosa por una beta-galactosidasa (lactasa) en el borde en cepillo de la mucosa intestinal. La glucosa y la galactosa son absorbidas en el intestino a través de un sistema dependiente de energía acoplado al Na (Fig 8.1a). Una vez en el torrente sanguíneo ingresa al hígado vía porta y el GLUT-

2, siendo este el órgano más importante para su metabolismo aunque también se metaboliza en cerebro y hematíes (Fig. 8.1b). Es necesario formar Glucosa-1P para obtener energía o para almacenamiento, por lo que debe seguir una serie de reacciones para llegar a ese punto. La primera reacción es fosforilar la Galactosa libre mediante la galactoquinasa (GK), para dar Galactosa-1P. Esta enzima se encuentra en glóbulos rojos, glóbulos blancos, fibroblastos, placenta e hígado (órgano donde se produce principalmente el metabolismo de galactosa).

Esa Galactosa-1P va a ser sustrato de la Galactosa-1P uridiltransferasa (Gal-T) junto con UDP-Glucosa para dar UDP-Galactosa y Glucosa-1P. Esta última va a seguir la vía de la glucólisis. Esta enzima se encuentra principalmente en hígado pero también en intestino, glóbulos rojos, fibroblastos. UDP-Galactosa puede convertirse a UDP-Glucosa mediante UDP-galactosa-4-epimerasa (Gal-E), que tiene la misma localización que la transferasa. Es la única reacción reversible y en estado estacionario esta desplazada 1:3 hacia la formación de UDP-Glucosa.

Hay otra reacción que da lugar a la formación de Galactosa-1P y Glucosa-1P a partir de la UDP-Gal y UDP-Glu, pero funciona al 1% de la transferasa (Fig 8.1b). Al aumentar la edad, la actividad de esa enzima aumenta hasta el 5%, y es catalizada por la UDP-hexosa pirofosforilasa. Esta reacción permite incorporar la galactosa de la Galactosa-1P a UDP-Galactosa y a su vez a UDP-Glucosa para ser incorporada al glucógeno, que a su vez aporta Glucosa-1P, mecanismo que permitiría oxidar hasta el 1% de la Galactosa ante la deficiencia de Gal-T. Además esta vía permite sintetizar UDP-Galactosa a partir de Glucosa-1P que no provenga del metabolismo normal de galactosa, para poder ser incorporada a glicoproteínas y glicolípidos, o puede ser convertida en Galactosa-1P y ésta en galactosa por medio de una fosfatasa. Así, se asegura una síntesis endógena de galactosa (para asegurar la síntesis de glucoconjugados) que es de 1-2 mg/kilo/hora en niños y 0,5-1 mg/día en adultos.

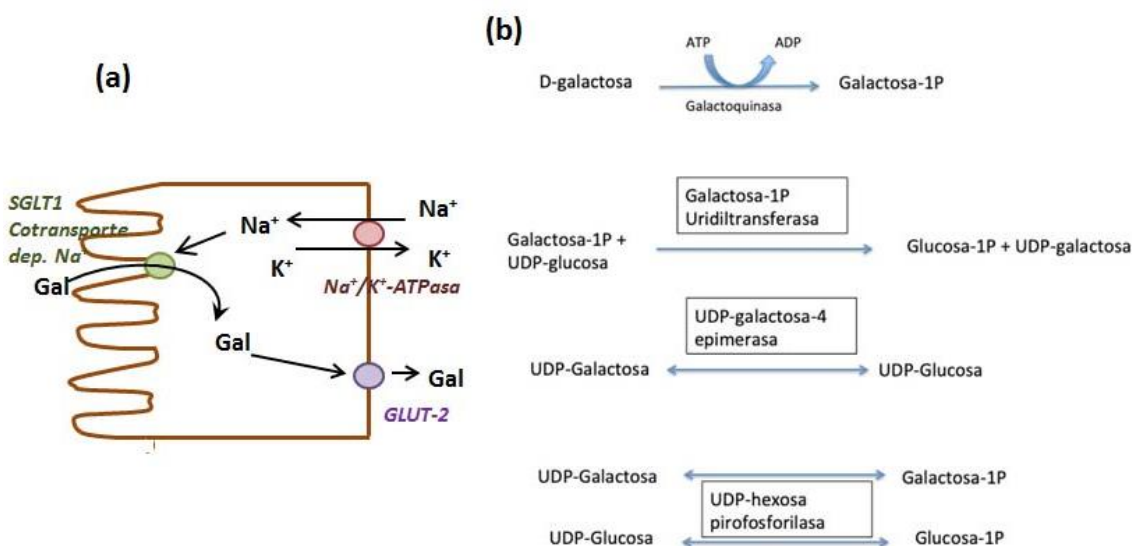


Figura 8.1. Metabolismo de galactosa. (a) Absorción y transporte intestinal (Adaptado de Writh, 2003). (b) Metabolismo hepático, vía de Leluar.

El metabolismo de galactosa no tiene control hormonal y sus niveles sanguíneos dependen de la ingesta, de la saturación de enzimas hepáticas y de la capacidad de excreción renal.

Cuando hay un bloqueo enzimático (Gal-T) aumentan los metabolitos, principalmente galactosa, que es metabolizada por vías secundarias:

- Galactosa a galactitol, por aldosa reductasa: enzima muy importante en la patogenia ya que se encuentra en cristalino, papilas renales, células de Schwann de nervios periféricos, que dan lugar a las manifestaciones clínicas.
- D-Galactosa a D-Galactonolactona mediante la utilización de NAD⁺ (reacción reversible) para dar ácido D-Galactónico que mediante el uso de otro NAD⁺ se convierte en ácido beta-ceto-D-Galactónico (reacción reversible). Este compuesto se descarboxila (C1) y da D-Xilulosa, la cual pasa a D-Xilulosa-5P para poder acceder a la vía de las pentosas fosfato y proceder a la oxidación total. Las primeras reacciones están catalizadas por la galactosa deshidrogenasa (Gal-DH) que requiere NAD⁺.

En pacientes con galactosemia, el galactitol se elimina por orina como tal. En cambio, el galactonato se elimina en parte como tal y parte es metabolizado en la vía de las pentosas (Fig. 8.2).

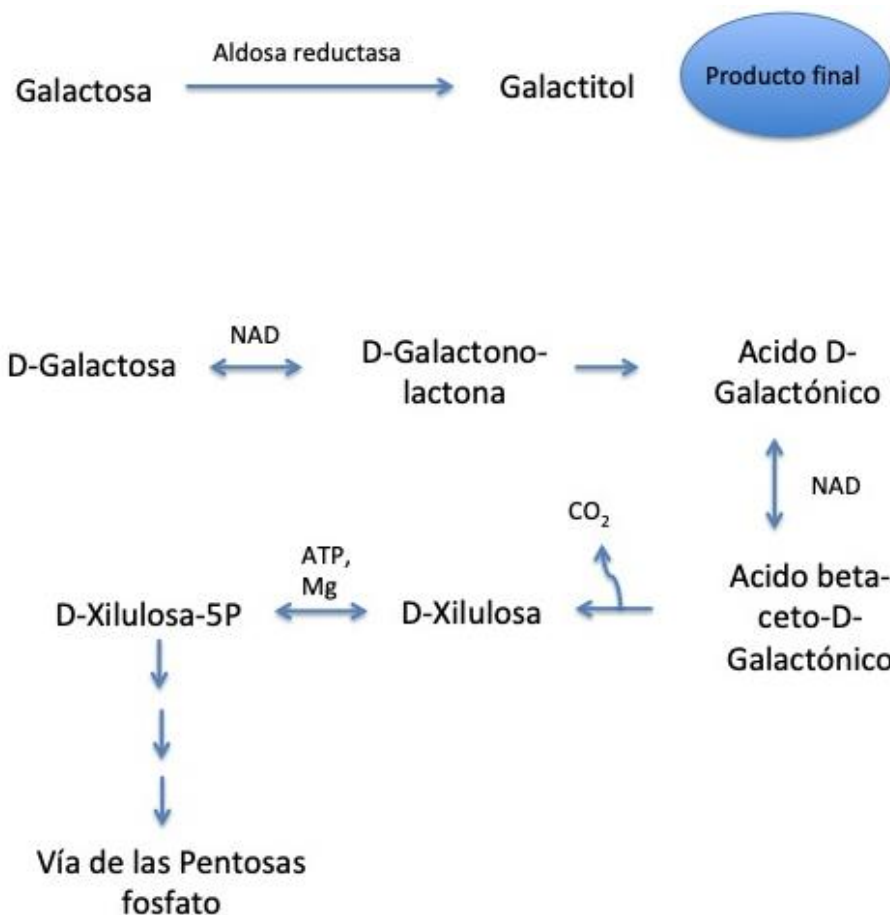


Figura 8.2. Metabolitos secundarios de galactosa.

Manifestaciones Clínicas

Como consecuencia de mutaciones en los genes que codifican para las tres enzimas involucradas en el metabolismo de la galactosa, se producen tres formas clínicas bien definidas de Galactosemias. Estas enfermedades son clínicamente heterogéneas, como consecuencia de las diferentes mutaciones y/o factores epigenéticos involucrados en su expresión.

Deficiencia de Gal-T o Galactosemia Clásica

En esta patología, la deficiencia severa de Gal-T se manifiesta con ausencia de su actividad en eritrocitos y en hígado y se presenta típicamente en el periodo neonatal.

El cuadro clínico agudo se caracteriza por trastornos gastrointestinales que hacen que rechacen los alimentos y por lo tanto hay retardo de crecimiento. Se presenta también con vómitos, diarrea, que van a conducir a un descenso de peso, letargia, hipotonía. La restricción dietaria de galactosa resuelve estas complicaciones. Si se continúa con la ingesta de leche, se producen efectos tóxicos: daño hepático, con aumento de tamaño del órgano, ictericia, y puede progresar hasta cirrosis. Se generan sangrados por la falta de factores de coagulación, hemólisis, por lo que en el examen hematológico se observan eritroblastos, disminución del hematocrito y la concentración de hemoglobina, que requiere de la realización de transfusiones.

Al mes de vida aparecen otros signos y síntomas como cataratas, ascitis (presencia de líquido en la cavidad abdominal, que es de mal pronóstico y mueren al poco tiempo), retraso mental que puede no ser severo, edema cerebral que da origen a un cuadro neurológico (aumento del volumen del cerebro con aumento de la presión intracraneal), es decir encefalopatía. Se pueden presentar también pseudotumores cerebrales, con predominancia en la fontanela. Pueden llegar a muerte por sepsis, dado que los pacientes son susceptibles a las infecciones, este es un cuadro muy severo, con gran deterioro de órganos, en el que se inhibe la actividad bactericida de los leucocitos. El cuadro general puede confundirse con una sepsis neonatal.

A pesar de un diagnóstico e implementación de restricción dietaria, los pacientes con galactosemia clásica desarrollan complicaciones tardías.

Cuadro Clínico avanzado: se presenta con el avance de los años:

- Daño cerebral
 - Deficiencia cognitiva. Retraso mental (IQ < 85%)
 - Afectación de funciones ejecutivas, aprendizaje, habla y lenguaje, problemas motores, déficit de memoria o integración social
- Insuficiencia ovárica primaria
 - Desarrollo puberal retrasado o ausente, amenorrea 1ria, 2daria u oligomenorrea y menopausia prematura
 - Infertilidad

- Alteraciones Oseas: se observa disminuida densidad ósea probablemente por déficit dietario de Ca^{2+} , insuficiencia ovárica en la mujer y restricciones para el ejercicio.

Se han descrito más de 200 mutaciones en el gen de Gal-T, que afectan al gen que codifica esta enzima. Dentro de las más comunes se encuentran mutaciones puntuales, las 3 más frecuentes son:

- Q188R (clásica) presente en América y Europa principalmente y la actividad enzimática tanto en glóbulos rojos como en hígado es del 0%.
- N314D (Duarte) presente en Japón, tiene actividad residual de la enzima, 50% tanto en glóbulos rojos como en hígado.
- S135L (negro) es una variante afroamericana en la cual la actividad en glóbulos rojos es 0% y en hígado del 10%. Esa actividad residual es suficiente para que no se manifieste el cuadro.

Se pueden producir combinaciones de mutaciones, que darían distintos porcentajes de actividad residual de Gal-T. Pueden requerir tratamiento durante los primeros meses de vida, pero luego no y los síntomas son más leves o pueden no tener.

Deficiencia de Galactokinasa (GK)

La deficiencia de GK, es una forma AR, que se presenta con una frecuencia de 1: 1.000.000. La ingesta de Gal produce un aumento en los niveles plasmáticos de Gal, galactosuria y presencia de altos niveles de galactitol en plasma y orina. La acumulación de galactitol se asocia con la aparición de cataratas, en las cuales la enzima aldosa reductasa juega un rol crítico transformando la galactosa en galactitol a nivel del cristalino. Se puede producir cataratas (primer síntoma que aparece si no se hizo la pesquisa neonatal) y ceguera, como también alteraciones neurológicas tardías debido al galactitol. No se genera retraso mental, aunque sí pueden aparecer pseudotumores.

Deficiencia de UDP-Galactosa-4-Epimerasa

La deficiencia de Gal-E, una forma rara AR, se presenta como un continuo de tres formas: generalizada, intermedia y periférica. La forma generalizada es la más grave, en la cual la deficiencia enzimática está presente en todos los tejidos. El cuadro clínico agudo, similar a la galactosemia clásica incluye hipotonía, problemas en la alimentación, vómitos, pérdida de peso, ictericia, hepatomegalia y afectación hepática. Hay algunas formas asintomáticas en las que el defecto solo se expresa en leucocitos y eritrocitos y se detectan solo a través de un examen sistemático neonatal. También hay formas con variada sintomatología y expresión variable en diversos tejidos y formas sistémicas con alteración enzimática generalizada, en la que los pacientes

presentan una forma clínica similar a la galactosemia clásica. El patrón bioquímico depende del genotipo y del déficit enzimático, con las formas más graves presentando aumento de galactosemia, galactitol, Gal-1P y de UDP-Gal, mientras que los pacientes asintomáticos pueden mostrar un patrón bioquímico normal.

Patofisiología de la Galactosemia Clásica

Las observaciones de complicaciones neonatales en la vía Leloir que llevan a un aumento en los niveles de gal-1-P, sugieren que este sería el metabolito tóxico patogénico clave.

Como se mencionó previamente, el galactitol producto de las vías secundarias del metabolismo de galactosa es excretado en orina. En un galactosémico tratado (restricción dietaria) también hay producción de galactitol, sugiriendo que hay una fuente endógena de galactosa que lo origina (Fig 8.3). El aumento de gal-1P se asocia con una disminución en los niveles celulares de P y de ATP.

El aumento de gal-1P produce cataratas en el cristalino, debido a un efecto osmótico del galactitol que es producido por la aldosa reductasa. Se produce la acumulación de agua, causando alteración de bombas transportadoras ($\text{Na}^+\text{-K}^+$), en el uso de la energía, se inhibe la glucosa-6P deshidrogenasa por galactosa-1P. Inicialmente el proceso es reversible pero termina produciendo opacidad completa y pérdida de la visión. Actualmente se cree que el estrés oxidativo es un factor patogénico importante. En el hígado, gal-1-P disminuye la reserva de glucógeno, la fosforilación de hexosas con la consecuente hipoglucemia. Este compuesto inhibe la fosfoglucomutasa. También debido al efecto osmótico del galactitol, se afecta el sistema nervioso central y periférico, se produce edema cerebral (encefalopatía). También se evidencia neuropatía periférica con disminución de la conducción nerviosa, disminución de serotonina o de receptores. Debido a la toxicidad de la galactosa, las gónadas manifiestan hipogonadismo hipergonadotrófico, principalmente debido a la falta de galactosilación de hormonas durante las modificaciones postraduccionales. El aumento de la galactosa-1P produce la inhibición de la UDP-galactosa galactosiltransferasa, impidiendo la galactosilación de proteínas.

La reacción de la enzima epimerasa es reversible y en individuos sanos está desplazada a la producción de UDP-glucosa. La dirección se desplaza hacia UDP-galactosa para producir la galactosilación de macromoléculas, requerido como modificación postraduccionales para el correcto funcionamiento de las mismas. Estas macromoléculas tienen un tiempo de vida media, luego del cual son degradadas y las moléculas de galactosa liberadas para formar parte del pool endógeno. Esta producción endógena de galactosa es la que produce efectos tóxicos y complicaciones tardías aún en pacientes tratados.

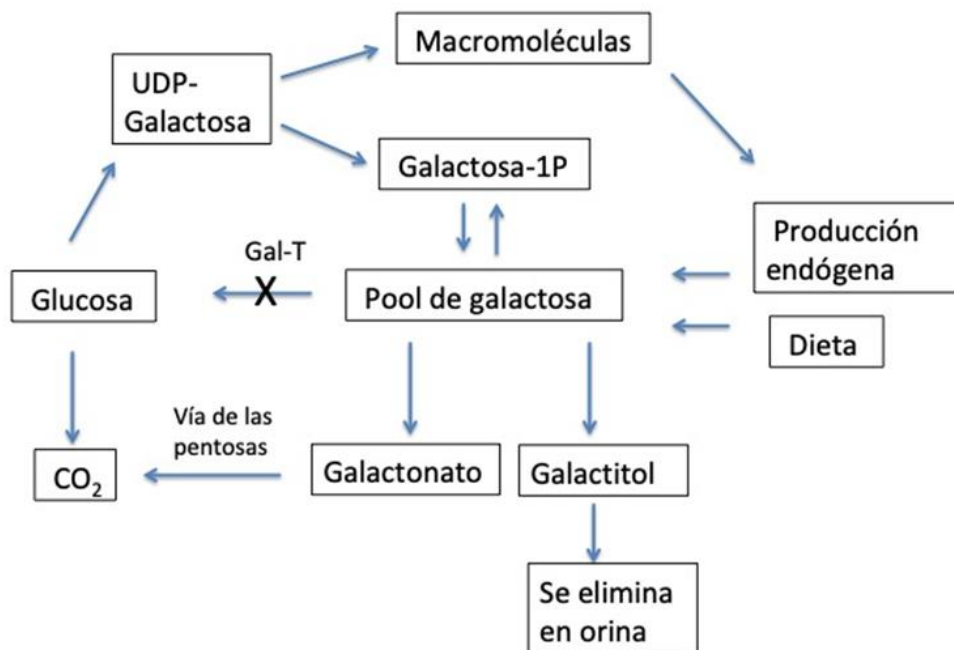


Figura 8.3. Producción endógena de galactosa

Las complicaciones tardías incluyen problemas psicológicos, ataxia cerebelar, temblores, defectos en el habla que requiere reeducación, disimetría, encefalopatía. También se desarrolla retraso mental progresivo aún con tratamiento. Se han visto alteraciones en la sustancia blanca, atrofia o insuficiencia ovárica, osteoporosis.

Se han estudiado a mujeres detectadas por clínica (todas sintomáticas) y sus hermanas por pesquisa, observando que en ambos casos presentaban una disminución del coeficiente intelectual, independientemente de la edad de inicio del tratamiento y cuán estricto era. Este efecto es producto de la autointoxicación como complicación a largo plazo.

Diagnostico

Se debe sospechar de galactosemia clásica en base a los signos y síntomas clínicos presentes en los pacientes, resultados de un screening neonatal y/o descubrimientos de laboratorio

El diagnóstico se confirma los niveles de gal-1-P, y la actividad enzimática de GAL-T en muestras de glóbulos rojos o pruebas genéticas moleculares del gen Gal-T.

El screening neonatal se basa en la evaluación de la actividad de Gal-T y/o los niveles de galactosa total.

Para otras formas de Galactosemias, deben buscarse otros metabolitos aumentados en sangre u orina, como galactosa, o UDP-galactosa. También puede investigarse los niveles alterados de las otras enzimas involucradas en el metabolismo de galactosa, como GK y Gal-E en sangre entera o impregnada en papel de filtro.

Tratamiento

La restricción dietaria de galactosa de por vida es el único tratamiento efectivo, relativamente fácil y rápido de implementar. Lo ideal es iniciarlo antes de los 7 días del nacimiento. Existen leches de soja de fácil acceso, pueden consumir alimentos naturales con bajo contenido de galactosa como frutas, verduras, hidrolizados de caseína, dextrina maltosa como fuente de hidratos de carbono. Deben tener especial cuidado con los medicamentos que ingieran ya que se utiliza galactosa como excipiente. Aunque la dieta es capaz de revertir el cuadro clínico neonatal, no previene la aparición de las complicaciones a largo término. Por esto es importante hacer un seguimiento de los pacientes, monitoreando la aparición de complicaciones para hacer un tratamiento más adecuado. Estas complicaciones son muy variables y no parecen relacionarse con la dieta

Debe comprobarse la integridad de la Gal-E si falla la Gal-T, debido a que la galactosilación de moléculas es vital. El tratamiento no debe interrumpirse, puede relajarse en la adolescencia. Durante el cuadro agudo de la enfermedad debe administrarse antibióticos, administrar proteínas, vitamina K, calcio. En estados críticos, hidrolizado de caseína y triglicéridos de cadena media.

El tratamiento para la deficiencia de GK y Gal-E, al igual que en la galactosemia clásica, es la restricción dietaria.

Consejo genético y evaluación de la familia en riesgo

Debe considerarse que la galactosemia clásica se hereda como un rasgo AR. Si los dos padres son *carriers* de una mutación patogénica del gen *GALT*, las probabilidades de tener un niño afectado son del 25% en cada embarazo. Los padres que ya tienen un niño afectado, también tienen un 25% de chances de tener otro hijo afectado en cada subsecuente embarazo. El feto en riesgo puede detectarse a través del diagnóstico prenatal usando métodos moleculares, buscando la mutación en la familia y usando muestras de vellosidades corionicas o amniocentesis. En caso de conocer la mutación, se puede investigar los niveles de Gal-T en amniocitos en cultivo. Además debe darse un correcto consejo genético a la familiar y asesorarla sobre las formas graves o formas leves (variantes) de esta enfermedad.

Referencias

- Demirbas D, Coelho AI, Rubio-Gozalbo ME, Berry GT. Hereditary Galactosemia *Metabolism*. 2018 Jun;83:188-196.
- Sanjurjo, P.; Baldellou, A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Capítulo 52. Ed. Ergon. Madrid, 2014.

Scriver, C. R; Beaudet, A. L; Sly, W. S; Valle, D.; Childs, B.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. The Metabolic and Molecular base of inherited disease. Vol. III, Chapter 72. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 8th edition (2001).

Wright, E.M.; Martín M.G.; Turk E. Intestinal absorption in health and disease—sugars. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 2003. Vol. 17, No. 6, pp. 943–956.

CAPÍTULO 9

Glucogenosis

Juan Manuel Fernández

Introducción

Las enfermedades de almacenamiento de glucógenos o también llamada glucogenosis, son un conjunto de enfermedades congénitas del metabolismo del glucógeno. Estas patologías (con una incidencia de de 1 en 25.000 nacidos vivos) llevan a una alteración anormal en los depósitos intracelulares del glucógeno, ya sea en cantidad, en calidad o en ambos, habiendo más de 15 formas diferentes, con un amplio espectro de presentación clínica. Los tejidos más afectados son el hígado y el músculo, pues el metabolismo del glucógeno en estos órganos es muy importante.

Metabolismo del Glucógeno

El glucógeno es un polímero ramificado de moléculas de glucosa que se almacena en el citosol de las células. Si bien su masa es variable, puede contener entre 20.000 a 30.000 unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces $1\rightarrow4$, lo cual le otorga una estructura helicoidal y por uniones $1\rightarrow6$, siendo estos últimos los enlaces minoritarios, pero esenciales para comenzar las ramificaciones (Fig 9.1).

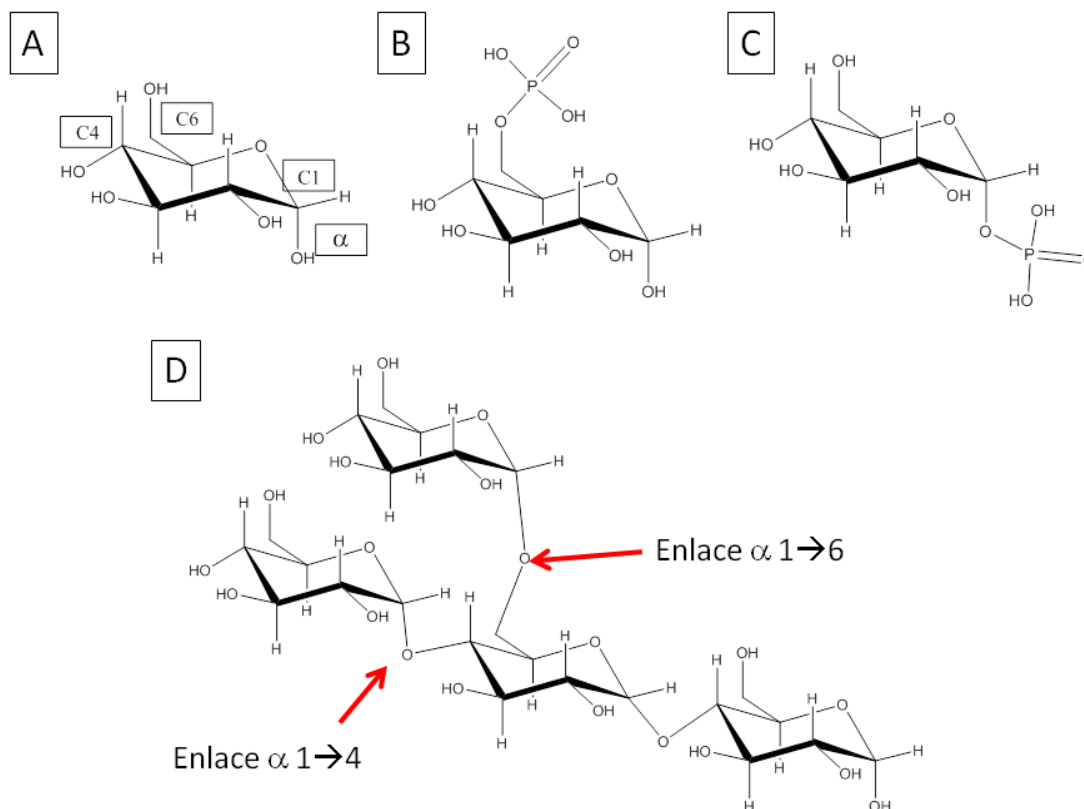


Figura 9.1. Estructura de A: glucosa; B: glucosa 6 fosfato; C: glucosa 1 fosfato y D: enlaces $\alpha 1 \rightarrow 4$ y $\alpha 1 \rightarrow 6$ que forman parte del glucógeno.

Esta forma de almacenar la glucosa en un polímero altamente ramificado, le confiere a las células varias ventajas. Una de ellas es la capacidad de almacenar gran cantidad de moléculas de glucosas sin aumentar la presión osmótica dentro de la célula, además, un gran número de extremos no reductores permite una rápida síntesis o degradación del glucógeno y por último, mayor solubilidad debida a la mayor exposición de grupos hidroxilos.

Las formas que toman las partículas de glucógeno dependerán del órgano donde se almacenen. En el musculo (cuya función es obtener energía frente a la contracción muscular), el glucógeno se almacena formando partículas llamadas α . Estas partículas α son estructuras esféricas que contienen alrededor de 60.000 moléculas de glucosa. En cuanto al hígado (cuya función es la homeostasis de la glucemia según el estado energético del organismo), el glucógeno se almacena en partículas llamadas β , las cuales están conformadas por una gran número de partículas α formando una estructura de tipo roseta. Estas últimas, son también llamadas glicosoma y son consideradas como estructuras dinámicas que contienen, además de glucógeno, las enzimas necesarias para poder llevar a cabo el metabolismo del mismo.

Síntesis del glucógeno

Para poder convertir la glucosa en glucógeno, esta debe ser previamente activada (Fig 9.2). Para esto, una molécula de glucosa-1-fosfato (glc-1P) es convertida a UDP-glucosa (UDP-glc)

gracias a la enzima UDP glucosa pirofosforilasa usando uridina trifosfato (UTP) como sustrato. La inicialización de la síntesis de glucógeno involucra una proteína primer. Luego, UDP-glc es unida al extremo no reductor de la molécula de glucógeno gracias a la enzima glucógeno sintasa.

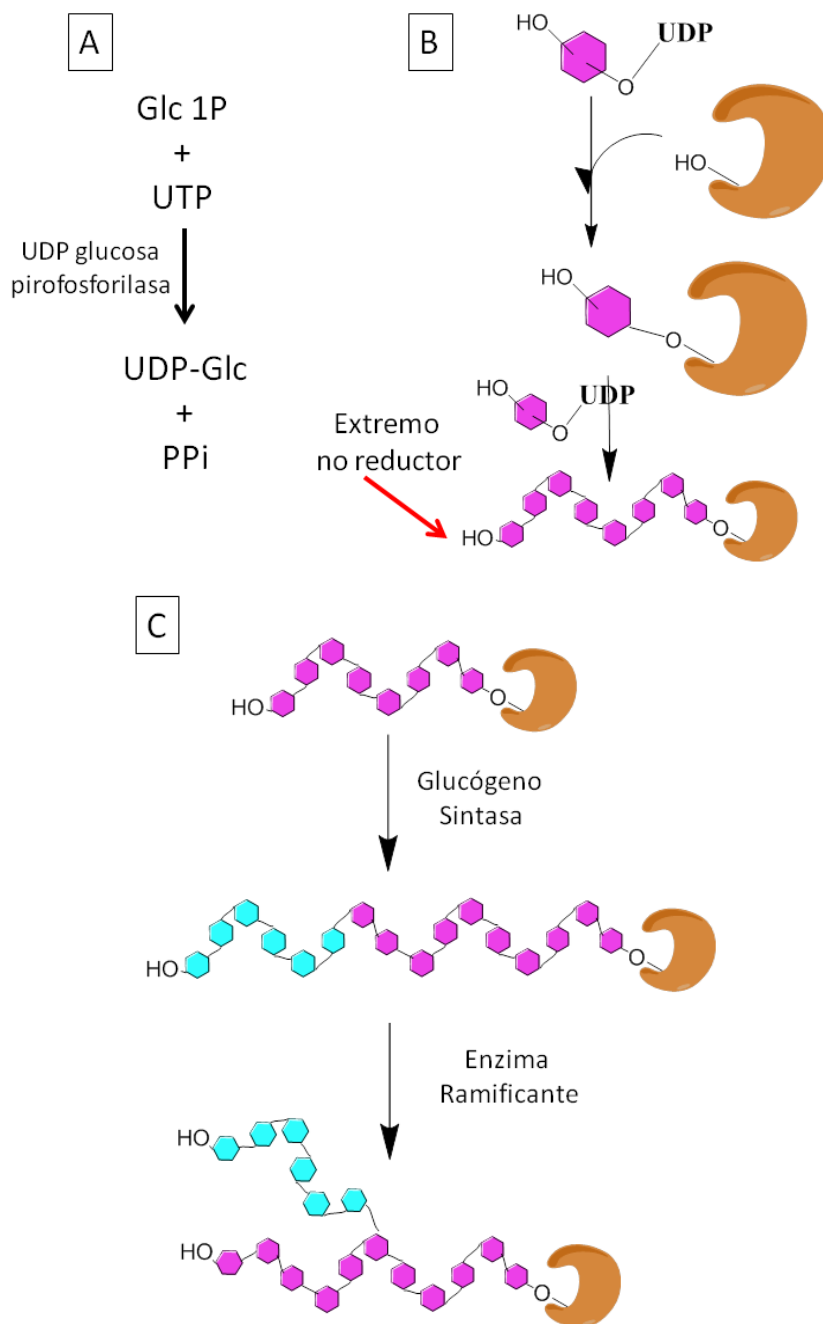


Figura 9.2. Síntesis de glucógeno. A: Activación de la glucosa. B: Inicialización de la síntesis mediante la formación del primer mediado por la glucogenina. C: Prolongación y ramificación del glucógeno mediante la glucógeno sintasa y la enzima ramificante.

Para comenzar la síntesis del glucógeno, se requiere de una molécula “primer” llamada glicogenina. Esta es una proteína cuyo gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 3 y posee la capacidad de autoglicosilarse. El inicio de la síntesis del glucógeno comienza cuando la glicogenina se autoglicosila en un residuo de tirosina, uniendo dos moléculas de glc. El segundo paso

consiste en la incorporación de 6 a 8 residuos de glc via autoglicosilacion dependiente de metales divalentes. Una vez que la glucogenina ha adquirido una cadena de 8 residuos de glc, se produce la elongación de la cadena gracias a la glucógeno sintasa. A medida que la síntesis progresa se obtiene un polímero lineal de glucosa. Para obtener una estructura ramificada, la enzima ramificante o glucosil 4,6 transferasa transfiere una cadena de 5 a 8 unidades de glc, rompiendo el enlace 1→4 y creando uno 1→6. Así, cada 8 a 10 unidades lineales de glc, existe una ramificación, aumentando el número de los extremos no reductores y por lo tanto, los sitios de elongación de la cadena y puntos de ataque para la degradación.

Degradación del glucógeno

La degradación del glucógeno es mediada por la enzima glucógeno fosforilasa, la cual hidroliza los enlaces 1→4 desde los extremos no reductores, liberando de a una glc a la vez. Esta reacción es una fosforólisis, por lo tanto, la glucosa es liberada como glc-1P conservando de esta forma la energía de los enlaces. Esta reacción se lleva a cabo hasta 4 residuos de glucosa antes de las ramificaciones. En este punto, la enzima desramificante toma las últimas tres unidades de glucosa y las tranfiere a otro extremo no reductor para que la glucógeno fosforilasa pueda continuar la degradación (Fig 9.3). Luego de esta transferencia se mantiene la glucosa que inicia la ramificación mediante la unión 1→6, y a continuación la enzima desramificante se encarga de romper esta unión liberando glucosa (no glucosa fosforilada).

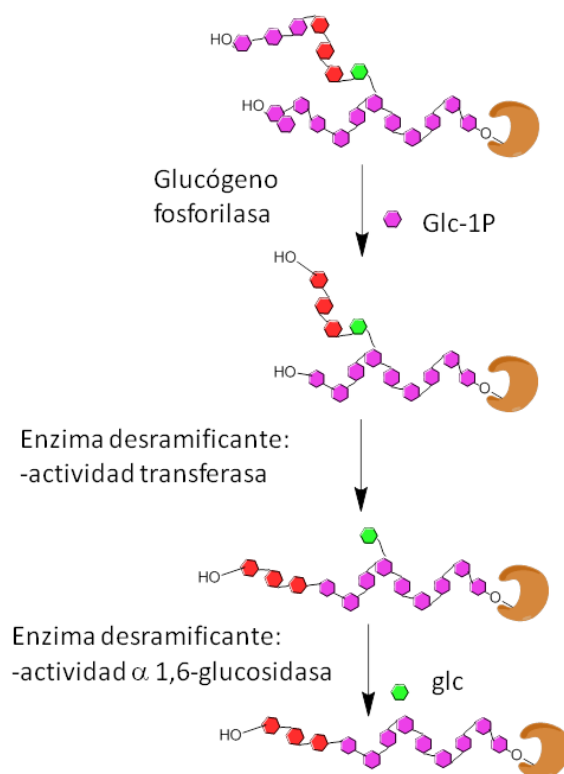


Figura 9.3. Glucogenolisis mediado por las enzimas glucógeno fosforilasa y enzima desramificante.

Una vez liberado la glucosa como glc-1P del glucógeno, la enzima fosfoglucomutasa cataliza la conversión en forma reversible a glc-6P, formando como intermediario la glucosa 1,6 bifosfato.

La desfosforilación de la glc-6P es catalizada por la enzima glucosa 6 fosfatasa. Esta enzima es la única que produce glc en altas cantidades, ya que la enzima desramificante, produce una cantidad mucho menor. La glucosa 6 fosfatasa, es una enzima que se encuentra en el hígado, riñón y células β del páncreas y forma parte de un sistema ubicado en la membrana del retículo endoplasmático donde además de la unidad catalítica se encuentran distintos transportadores altamente específicos, uno para la glc-6P (también llamado translocasa), otro para la glc (GLUT 7) y un tercero para el Pi (que también transporta PPI) (Fig. 9.4). Además, la expresión de la unidad catalítica se encuentra regulada en forma negativa por la insulina.

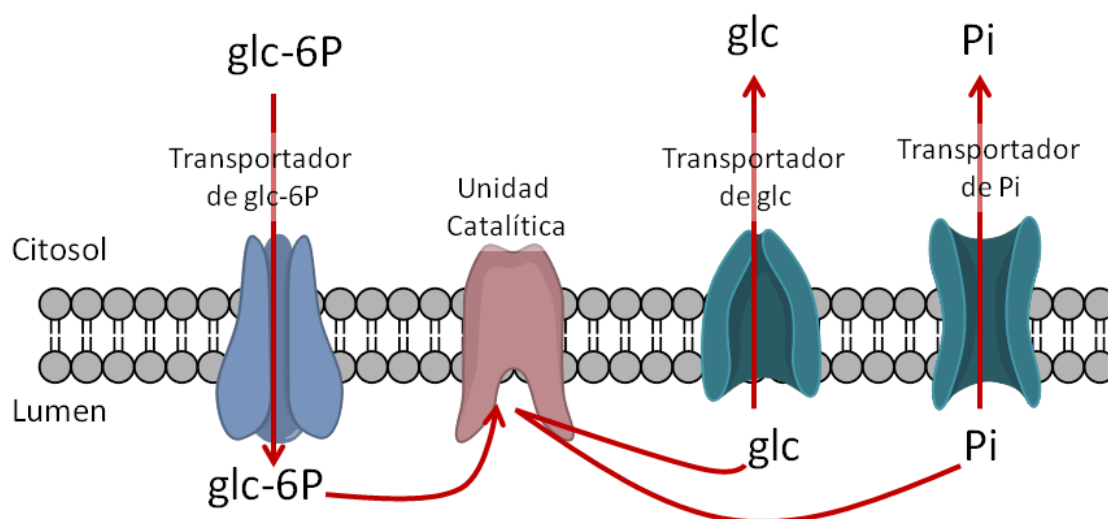


Figura 9.4. Modelo del sistema de la glucosa 6 fosfatasa, formado por un transportador de glc-6P, la unidad catalítica, un transportador de glc y un transportador de Pi. (Imagen adaptada de Scriver)

Recientemente, se han descrito dos enzimas que poseen capacidad de desfosforilar a la glc-6P. Una de ellas es la glucógeno 6 fosfatasa β , encargada de metabolizar la glc-6P que proviene del metabolismo del glucógeno y la otra es la glucógeno 6 fosfatasa α , una forma ubicua pero no presenta relación con la homeostasis del glucógeno.

En la figura 9.5, se puede observar una secuencia de pasos que involucra a la glucosa y al glucógeno en dos estados, luego de la ingestión de una dieta (estado pos prandial) y en el ayuno. Se puede observar que la glucosa proveniente de la dieta, luego de entrar al hepatocito a través del transportador GLUT 2, es transformada a glc-6P por medio de la glucoquinasa (1), la cual es transformada a glc-1P gracias a la fosfoglucoquinasa (2). Luego de este paso, se activa la glucosa 1P gracias a la enzima UDP glucosa pirofosforilasa (3) para dar UDP-glc. Este último es sustrato para formar glucógeno gracias a la glucogenina, glucógeno sintasa y la enzima ramificante (4). Cuando el cuerpo se encuentra en estado de ayuno, el hígado comienza el catabolismo

del glucógeno mediante la glucógeno fosforilasa y la enzima desramificante para obtener glc-1P y en menor proporción glc (5). La glucosa puede salir a circulación gracias al transportador GLUT 2, no así la glc-1P, la cual antes debe transformarse en glc-6P gracias a la enzima fosfoglucomutasa (6). Una vez formada la glc-6P, esta es desfosforilada mediante el sistema glucosa 6 fosfatasa (7) para luego salir a circulación.

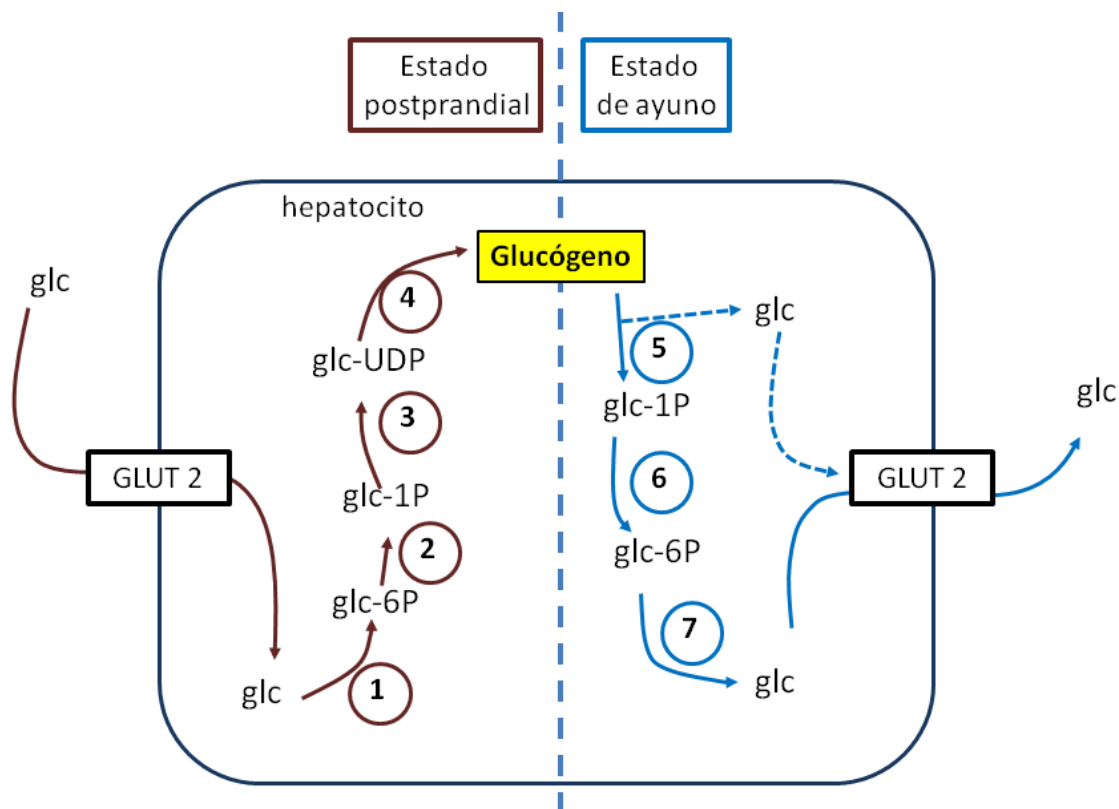


Figura 9.5. Síntesis y degradación de glucógeno en el hígado en estados postprandial y en ayuno.

Glucogenosis

Las glucogenosis, constituyen un conjunto de enfermedades ocasionadas por defectos en el metabolismo del glucógeno. Se las pueden clasificar (Tabla 1) según a) el órgano principal afectado, es decir, en hepáticas, en musculares o en sistémicas; b) el orden cronológico en que fueron descubiertas o c) una clasificación más actual donde la enfermedad es primaria o secundaria.

Tabla 9.1

Clasificación clásica		
Según fecha de aparición	Según órgano afectado	Enzima afectada
0	Hígado	Glucógeno sintetasa
Ia (o Von Gierke)	Hígado	Glucosa 6 fosfatasa
Ib	Hígado	Translocasa
II (o Pompe)	Sistémica	-glucosidasa
IIb (o pseudo Pompe)	Sistémica	LAMP 2
III (o Cori, Forbes)	Hígado/Músculo	Enzima desramificante
IV (o Anderson)	Hígado	Enzima ramificante
V (o McArdle)	Músculo	Miofosforilasa
VI (o Hers)	Hígado	Fosforilasa
VII (o Tauri)	Músculo	Fosfoglucoquinasas
IX	Hígado	Fosforilas □ quinasa
X	Músculo	Fosfoglicerato mutasa
XI	Músculo	Lactico Deshidrogenasa
XII	Músculo	Aldosa A
XIII	Músculo	□-enolasa
Nueva clasificación		
Clasificación	Participación en:	Ejemplo
Primarias	Defectos en la síntesis o degradación del glucógeno.	GSD 0, GSD III, GSD V
	Defecto en la glucogenolisis en músculo y glóbulos rojos.	GSD VII, GSD X, GSD XII
	Defecto en la liberación de la glicosa a sangre desde el hígado o riñón.	GSD Ia, GSD Ib
	Defecto en el aclaramiento del glucógeno en los lisosomas.	GSD II
Secundarias	Defectos en proteínas que intervienen en la regulación de las vías anteriores.	PKA, fosforilasa kinasa

Glucogenosis tipo I (o enfermedad de von Gierke)

Fue descrita por primera vez en 1929 por von Gierke como una “hepatomegalia glicogénica”, en 1952, se demostró que esta enfermedad consiste en una ausencia de actividad de la enzima glucosa 6 fosfatasa. Años más tarde, se observó un grupo de pacientes con el cuadro clínico de este tipo de glucogenosis, pero con actividad normal de la enzima, llamándose a este tipo glucogenosis Ib, demostrándose hacia finales de 1970 que este subtipo era debido a la falta de actividad de la translocasa. Estos dos tipos de presentación, se caracterizan por un aumento en los niveles de glucógeno en las células hepáticas y renales, llevando además, a una inadecuada producción de glc hepática por deficiencia en la gluconeogénesis y glucogenolisis. Su tipo de herencia es autosómica recesiva.

Características clínicas y bioquímicas

Los pacientes pueden presentar hiperglicemia y acidosis láctica desde el periodo neonatal, pero recién a los 3 o 4 meses aparecen la hepatomegalia y convulsiones (causado por la baja concentración de glc en sangre). Debido a la acumulación de tejido adiposo en la mejillas, los bebés suelen presentar un signo llamado “rostro de muñeca”, además de extremidades delgadas, y un abdomen protuberante debido a la hepatomegalia. Se observan también los riñones agrandados en forma simétrica pero el bazo y corazón con tamaño normal. Durante la infancia, pueden encontrarse xantomas en las extremidades y lesiones paramaculares de color amarillo en las retinas, asociados a la gravedad de la hiperlipemia. Debido a un deterioro en la agregación y adhesión plaquetaria, estos pacientes poseen un tiempo de sangría elevado haciendo que presenten moretones y epistaxis. La hiperuricemia está presente desde temprana edad, pero la gota no se presenta hasta entrada la pubertad. En un examen histológico del hígado se encuentra una distensión de los hepatocitos por glucógeno y almacenamiento de lípidos. En cuanto a la hiperlipemia, se caracteriza por un plasma lechoso debido al aumento de los triglicéridos, además se encuentran aumentado (aunque en menor grado) el colesterol y los fosfolípidos. Los niveles de VLDL y LDL son elevados, asemejándose a una dislipemia tipo IV. Además, se encuentran aumentados los niveles de apo B, C y E mientras que son normales o levemente disminuidos los niveles de apo A y D. Para los casos del tipo Ib, además de las manifestaciones clínicas anteriores, se suele encontrar neutropenia y daño en la función de los neutrófilos, los que se asocia con infecciones reiteradas por bacterias. Es común la ulceración de las mucosas oral e intestinal llevando a una inflamación intestinal crónica.

A pesar de que el glucógeno se almacena en el hígado y riñón, pueden aparecer complicaciones tardías en pacientes que no han sido adecuadamente tratados. Estas complicaciones pueden ser, fallo multiorgánico en estado adulto, retraso en el crecimiento y desarrollo puberal, ovarios poliquísticos sin afectación de la fertilidad, gota en la adolescencia, riesgo aumentado de

pancreatitis debido a hiperlipemia, riesgo cardiovascular, adenomas hepáticos, complicaciones renales y osteoporosis.

Patofisiología

Hipoglucemia

Debido a que la glc-6P proveniente de la glucogenolisis, gluconeogénesis o desde la glucoquinasa se acumula en el hepatocito, la glc-6P comienza la vía de la glucólisis, aumentando la producción de lactato, siendo este un combustible para el cerebro cuando existe escases de glucosa en sangre.

Hiperuricemia

La hiperuricemia puede explicarse por dos mecanismos, una disminución en el clearance glucoquinasa se acumula en el hepatocito, la glc-6P comienza la vía de la glucólisis, aumentando la producción de lactato, siendo este un combustible para el cerebro cuando existe escases de glucosa en sangre.

Hiperuricemia

La hiperuricemia puede explicarse por dos mecanismos, una disminución en el clearance renal y un aumento en su producción. El primero resulta de la competencia en la excreción renal entre el lactato y el ácido úrico, de esta forma, hay una disminución en los niveles de eliminación del ácido úrico que aumenta en sangre. El segundo mecanismo se debería a un aumento en la síntesis del ácido úrico debido a un desbloqueo en la AMP deaminasa hepática que ocurre como consecuencia de una disminución en el Pi intracelular. Esto libera el bloqueo fisiológico de la enzima, incrementa la degradación de nucleótidos y la producción de ácido úrico.

Hiperlipemia

A pesar de que los niveles de almacenamiento de glc en el hígado están elevados, desde el punto de vista de los tejidos periféricos, el organismo se encuentra en una situación de ayuno debido a la hipoglucemia, entrando en un estado de hipoinsulinemia y aumento de las hormonas contraregulatorias. Este estado, produce una degradación de los depósitos de lípido de tejido adiposo, los cuales son enviados al hígado para producir TG-VLDL. Además, el aumento de la glucólisis, aumentando la síntesis de glicerol fosfato y acetil CoA, lo que lleva a un aumento en la lipogénesis en el hígado. Además, debido al aumento del ac. pirúvico, hay un aumento en la síntesis de malonil CoA que lleva un bloqueo en la β oxidación lipídica y por lo tanto, disminución en la degradación de los ácidos grasos. Por otro lado el hipoinsulinismo, disminuye la actividad de la lipoprotein lipasa y la utilización periférica de los ácidos grasos. De esta forma, en los plasmas de estos pacientes, hay mayor concentración de TG-VLDL con un menor aclaramiento de los mismos.

Diagnostico

El diagnostico de esta patología se basa en la combinación de aspectos clínicos y determinaciones bioquímicas. La presencia de hepatomegalia, hipoglucemia severa en ayunas, acompañada de aumento de ácido láctico, lípidos y ácido úrico es indicativo de glucogenosis tipo I.

Como parte del diagnostico se puede realizar la prueba de administración de glucagón en ayunas. Durante esta prueba se observa un aumento de los niveles de ac. láctico en circulación sin aumento de la glucemia. Sin embargo, debido al riesgo a sufrir una acidosis láctica aguda y descompensación (por aumento de lactato en sangre), actualmente esta prueba no es recomendada. Existen diferentes estudios moleculares (secuenciación, PCR, etc) que permiten llegar a un diagnostico e incluso diferencial entre tipo Ia y Ib sin realizar biopsias hepáticas. Además, estos estudios permiten realizar el diagnostico prenatal a partir de la utilización de muestras de amniocitos o vellosidades coriales.

Tratamiento

El objetivo del tratamiento es poder mantener la normoglucemia durante el todo el día, tratando de evitar la hipoglucemia y la acidosis láctica, pudiendo así reducir la morbilidad de los pacientes. Para ello, los pacientes deben comer con mayor frecuencia, ingiriendo fuentes de hidratos de carbono de absorción lenta tales como arroz, pastas o legumbre en lugar de hidratos de carbono de absorción rápida como la fructosa y sacarosa. En cuanto al tratamiento nocturno se puede utilizar alimentación parenteral o infusión nasogástrica nocturna con glucosa, siendo de vital importancia que las administraciones de las infusiones comiencen a la hora de la última comida y terminen hasta 15 minutos antes del desayuno. La administración de almidón de maíz sin cocción resulta una fuente de glucosa de liberación lenta, permitiendo prolongar el tiempo entre comidas. Además, debido a la hiperlipemia, las dietas deben ser bajas en contenido lipídico. Para disminuir la hiperuricemia, se suele administrar alopurinol. Adicionalmente, para la forma de tipo Ib, es importante corregir la neutropenia para disminuir la frecuencia de infecciones, para lo cual se administra factor estimulante de colonia monocítica. En caso de no poder corregir el problema metabólico y/o que existan adenomas hepáticos múltiples con riesgo de malignidad, se recomienda el trasplante hepático. En cuanto a los problemas renales, se puede realizar trasplante renal cuando el compromiso renal es muy importante. Respecto al pronóstico, la reducción de los síntomas, adenomas y complicaciones tardías dependerán de la adhesión y tiempo de inicio del tratamiento.

Glucogenosis tipo III (o enfermedad de Cori)

Esta enfermedad se debe a una falta de actividad de la enzima amilo 1,6 glucosidasa (enzima desramificante) y se manifiesta con una forma de herencia es autosómica recesiva. En esta glucogenosis, se acumula un glucógeno con dextrinas límites disminuyendo así la capacidad de liberación de glc. Existen tres clases de glucogenosis de tipo III, cuando hay afectación hepática y muscular, la cual representa el 85 % de los casos (tipo IIIa) y la de tipo IIIb que afecta solo a hígado y corresponde al 15% de los casos restante. Además, aunque son muy raras, existen dos clases más de glucogenosis tipo III. El caso en que la mutación del gen produce solo pérdida selectiva de la actividad glucosidasa (tipo IIIc) o el caso en que se pierde la función de transferasa (tipo IIId). La prevalencia de la Glucogenosis tipo III es de 1:100.000 y la clínica, a pesar de ser similar a la tipo I, es más leve y los pacientes pueden soportar mayor tiempo de ayuno. No obstante, en lactantes o en niños el cuadro clínico resulta indistinguible de la tipo I, manifestando hepatomegalia (con mínima o nula infiltración grasa), hipoglucemia en ayuna con cetoacidosis, hiperlipemia y retraso en el crecimiento. La esplenomegalia aparece si los pacientes poseen hepatopatía fibrosante y el 25% de los pacientes pueden presentar adenomas hepáticos. Hacia la tercera o cuarta década de vida, puede haber debilidad muscular con elevados niveles de CPK. No hay afectación renal, pero pueden tener hipertrofia ventricular. En estos pacientes se pueden encontrar altos los niveles de las transaminasas, mientras que los niveles de ácido úrico y lactato en sangre son normales (o moderadamente elevados).

Fisiopatología

Debido a la falta de la enzima desramificante, la degradación de glucógeno conduce a la liberación de glc desde los extremos no reductores, hasta alcanzar 4-5 residuos de glc previos a la ramificación del glucógeno. Si bien estos pacientes pueden permanecer por tiempos más prolongados en ayunas comparado con los pacientes con la glucogenosis tipo I, en las células se acumula un glucógeno con estructura anormal. Además, debido a que la capacidad de gluconeogénesis esta preservada, la degradación de proteínas musculares para obtener aminoácidos glucogénicos lleva a debilidad muscular y miopatías.

Diagnostico

El diagnostico puede realizarse a través de diferentes pruebas. Una de ella es a partir de biopsias hepáticas y/o musculares donde se observa un aumento en los niveles de glucógeno. En el caso del hígado, se encuentran niveles entre 15-21 gr de glucógeno por cada 100 gr de tejido (en el hígado normal, el glucógeno llega a una concentración de 6% p/p) mientras que en el musculo se puede observar una concentración de 6% p/p en comparación con un grupo control

que presenta niveles de 1,5% p/p. Además, se puede evaluar la actividad enzimática en muestras de biopsias, glóbulos rojos, leucocitos o fibroblastos de piel, combinando estas evaluaciones con análisis molecular en leucocitos.

Tratamiento

Si bien el objetivo del tratamiento es similar al aplicado en caso de pacientes con glucogenosis tipo I, en este caso el tratamiento es más flexible y menos demandante y sin restricción de fructosa y galactosa. Sin embargo, para mejorar la eficacia del tratamiento, es necesaria la ingestión de almidón de maíz crudo y sondas nasogástricas. En cuanto a la miopatía progresiva, no existe un tratamiento específico ni tampoco se observa mejora con el trasplante hepático, sin embargo, se han descrito mejoras en la cardiomiopatía utilizando dietas con alto contenido proteico. El trasplante hepático se lleva a cabo si hay un hígado cirrótico o con riesgo de malignización por presencia de adenomas.

Glucogenosis tipo II (o enfermedad de Pompe)

La enfermedad de Pompe se debe a la acumulación de glucógeno en los lisosomas debido a una alteración de la enzima glucosidasa ácida lisosomal (también llamada maltasa ácida) con una actividad menor al 30% del valor normal. En este caso, la síntesis y degradación del glucógeno no se encuentran afectadas. La enfermedad se transmite con herencia autosómica recesiva y con una prevalencia de 1: 40.000 nacidos vivos. Durante el proceso de formación de los lisosomas, el glucógeno queda atrapado en ellos y este es degradado por parte de la enzima glucosidasa ácida lisosomal y la glic producida es eliminada del lisosoma mediante la translocasa LAMP 2. De esta forma, cuando hay un déficit de la enzima se acumulan el glucógeno dentro de los lisosomas. En el músculo el glucógeno se acumula en pequeñas estructuras, que con el tiempo se fusionan alterando la arquitectura de las fibras musculares. Finalmente los lisosomas se rompen, vertiendo su contenido (entre ellos el glucógeno) al citoplasma. Otro mecanismo resulta en la alteración de los autofagosomas, aumentando la acumulación de los mismos y alterando la estructura contráctil de las fibras musculares. Esta enfermedad produce daño en muchos órganos y tejidos debido a que la formación de los lisosomas no es exclusiva de un tipo celular y los síntomas dependerán del tipo de mutación. En cuanto a la clasificación, ésta enfermedad se la clasifica en clásica del lactante, forma no clásica del lactante y de inicio tardío, las cuales pueden ser de forma juvenil o adulta. Si bien las clasificaciones son arbitrarias, estas patologías resultan ser un espectro continuo donde se solapa la edad de aparición de los síntomas, la tasa de progresión y los órganos afectados. También se describió un tipo IIb asociado a la mutación en el LAMP 2.

Manifestaciones clínicas

Las características clínicas de esta enfermedad abarcan un abanico de fenotipos donde todos incluyen un cierto grado de miopatías, variando la edad de inicio de síntomas, gravedad de los órganos afectados y mortalidad. Las formas más graves de la enfermedad son las clásicas con manifestaciones tempranas (dentro del año de vida) con hipotonía y cardiomiopatía severa y muerte. En las formas más leves, las manifestaciones clínicas aparecen a edad adulta, incluyendo 60 años de edad, donde el órgano afectado es el musculo esquelético. Las formas de presentación dependerán de la actividad residual de la enzima, cuanto menor sea la actividad enzimática, mas pronto se producen los daños orgánicos y más temprano comienza la sintomatología.

Forma clásica del lactante

La forma clásica fue la descrita por Pompe en el año 1954. Independientemente de la severidad del cuadro clínico, los síntomas comienzan dentro del primer año de vida. Al evaluar la actividad enzimática en muestras de fibroblastos de piel resulta menor del 1%. La edad promedio de inicio de los síntomas es de 4 meses, con una edad promedio de asistencia respiratoria de 6 meses de edad. Sin un tratamiento, la causa de muerte debido a falla cardiorrespiratoria es alrededor de los 9 meses de edad. Esta es una enfermedad multisistémica y rápidamente progresiva, causando daños en todos los tipos de músculos, hipotonía, problemas en la deglución, retraso en el crecimiento, miopatías, macroglosia, hepatomegalia, miocardiopatía con cardiomegalia e infecciones respiratorias recurrentes. Las transaminasas se encuentran elevadas y CPK se puede presentar hasta 10 veces el valor normal.>

Forma no clásica del lactante

Este subtipo ocurre también dentro del año de vida, pero con una actividad residual de la enzima mayor al 1% pero menor de 10%. La sintomatología es idéntica al anterior, pero más leve, con progresión más lenta y sin afectación cardiopática; es por ello que a esta forma se la suele llamar también “variante muscular de la forma infantil”

Las formas de comienzo tardío pueden tener inicio de la sintomatología luego del año de vida, pudiendo ser luego de los 25 o incluso de los 60 años. No obstante, se las ha clasificado como la juvenil y del adulto.

Forma juvenil. En estos casos, la actividad enzimática es mayor al 10%, pero menor del 30%. Los síntomas suelen presentarse a partir del primer año de edad con una aparición promedio de 4 años. El órgano más afectado es el musculo esquelético y generalmente no hay manifestaciones de problemas cardiacos, sin embargo, algunas veces se puede encontrar anomalías en los electrocardiogramas o presencias de arritmias.

Forma adulta: En esta forma, la actividad enzimática es mayor al 30% y puede manifestarse en cualquier momento dentro de la adultez con una edad promedio de aparición de 24 años,

siendo afectado solamente al músculo esquelético. Se presenta con debilidad y atrofia muscular, donde la debilidad muscular de los miembros inferiores presenta la mayor frecuencia. También hay afectación de los músculos de los miembros superiores, músculos axiales, abdominales, y paravertebrales. Los músculos flexores del cuello se encuentran comprometidos. En algunos pacientes se puede presentar problemas respiratorios que pueden llevar a infecciones.

Diagnostico

El diagnostico se basa en el estudio de biopsias musculares y determinación de la actividad enzimática. En las biopsias se encuentran depósitos de glucógeno entre las fibras musculares. Inicialmente es lisosomal, pero con el tiempo, estos lisosomas se rompen apareciendo glucógeno en el citoplasma. En cuanto a la actividad enzimática, se puede realizar usando muestras de linfocitos, fibroblastos de piel o directamente desde las fibras musculares de las biopsias. Si bien la toma de sangre es menos cruenta que la obtención de fibroblasto, esta última es más sensible y específica, con menor número de resultados falsos debido a la ausencia de maltasas neutras, las cuales se encuentran presentes en los leucocitos.

El diagnostico neonatal puede ser realizado a través de muestras recolectadas en papel de filtro mediante métodos fluorométricos o mediante espectrometría de masa en tándem.

Tratamiento

Debido a que se encuentran afectados muchos órganos, es necesario un abordaje multidisciplinario. Mas allá de esto, existen dos tipos de tratamientos según sus objetivos: sintomático y el de reemplazo enzimático.

Tratamiento sintomático

El abordaje del tratamiento debe ser multidisciplinario y está enfocado a diversos síntomas:

- 1.- Tratamiento respiratorio: generalmente, los pacientes no necesitan de broncodilatadores, pero si del manejo de la eliminación de secreciones ya sea utilizando técnicas mecánicas o manuales de limpieza. Administración de fármacos para tratamiento de infecciones y vacunas como prevención.
- 2.- Tratamiento cardiológico: Según el estado de los infantes y la etapa de progresión de la enfermedad, se pueden administrar fármacos inotrópicos, diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o betabloqueantes, sin embargo, es necesario realizar un seguimiento constante de las funciones cardíacas

3.- Nutricional: la pérdida de peso es importante en el comienzo de los síntomas de las formas tardías, por lo que debe aumentarse el aporte calórico y proteico. En cuanto a las formas del lactante, muchas veces es necesaria la alimentación por vía nasogástrica.

4.- Fisioterapia: es necesario planificar actividad física para poder fortalecer las fibras musculares.

Tratamiento de reemplazo enzimático

A finales de los años '90 se realizaron los primeros ensayos en humanos con la enzima recombinante humana. Estas enzimas estaban unidas a manosa 6P, el cual se une al receptor de superficie celular para que la misma sea internalizada en los lisosomas. En el 2006, la FDA aprueba la utilización de estas enzimas recombinantes como tratamiento, cuya administración se realiza en forma intravenosa cada 15 días. De esta forma, muchos pacientes de la variante infantil han mejorado su expectativa de vida, disminuyendo la cardiomegalia, y mejorando las funciones de los músculos (cardíaco y esquelético).

Referencias

- Bandsman, RHJ; Smit, GPA; Kuipers F. (2002). Disturbed lipid metabolism in glycogen storage disease type 1. *Eur. J. Pediatr.* , 161, s65.
- Dubrovsky A. (2014) et. al. Consenso argentino para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la enfermedad de Pompe. *Neurología Argentina.*, 6, 96.
- Rajas F, Gautier-Stein A, Mithieux G. (2019). Glucose-6 phosphate, a central hub for liver carbohydrate metabolism. *Metabolites.*, 9, 282.
- Sanjurjo, P.; Baldellou, A. (2014) Capítulo 26. Enfermedades de almacenamiento de glucógeno y trastornos relacionados. Ed. Ergon. Madrid,.
- Sanjurjo, P.; Baldellou, A. (2014). Capítulo 65. Enfermedad de Pompe. Ed. Ergon. Madrid.
- Scriver's The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Cap 71: Glycogen storage diseases, 8th edition, McGraw Hill, 2001.
- Scriver's The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Cap 135: Glycogen storage diseases Type II, 8th edition, McGraw Hill, 2001.

PARTE IV

Alteraciones del metabolismo de lipidos

CAPÍTULO 10

Metabolismo de Lipoproteínas y Clasificación de Hiperlipoproteinemias. Aterosclerosis

Ana M. Cortizo

Metabolismo normal de lipoproteínas.

Las lipoproteínas (LP) son partículas esféricas que contienen una cubierta superficial de fosfolípidos (FL), colesterol libre (Col) y apolipoproteínas, y un centro (*core*) de lípidos neutros con colesterol esterificado (CE) y triglicéridos (TG) (Fig. 10.1).

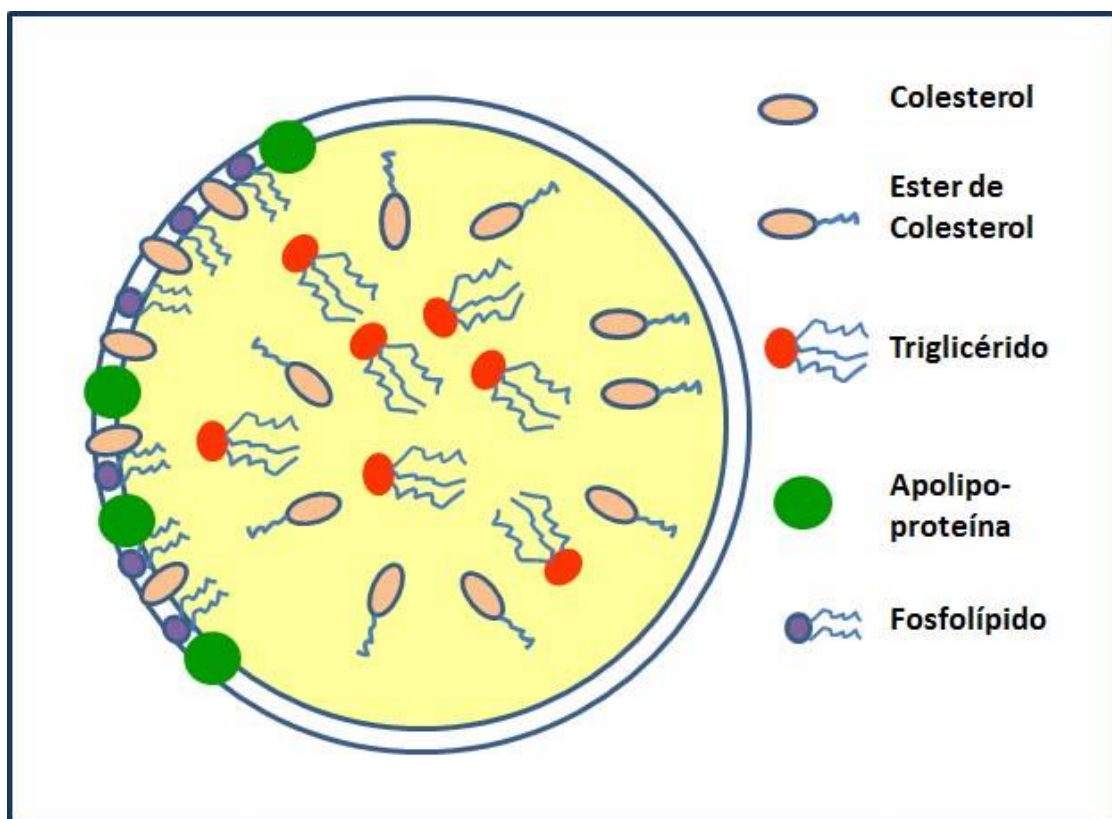


Figura 10.1. Estructura de las lipoproteínas

Las LP se pueden clasificar en base a su densidad y a su movilidad electroforética sobre tiras de acetato de celulosa (Fig. 10.2).

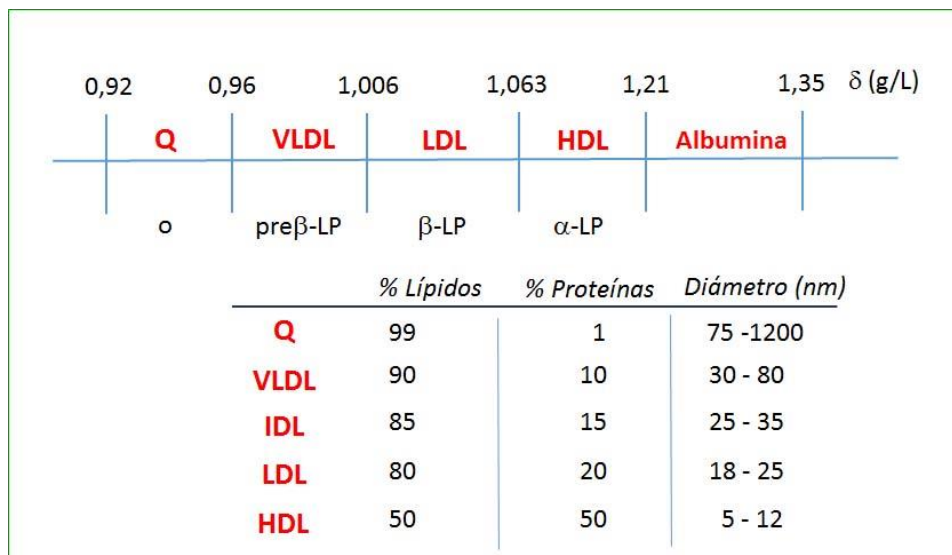


Figura 10.2. Separación de LP según su movilidad y densidad. Q, quilomicrones; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad. o, origen.

Las diferentes LP poseen diferente composición de Lípidos y proteínas, así como tamaños, siendo las más grandes y menos densas los Quilomicrones (Q), que contienen mayor porcentaje de lípidos respecto a las proteínas. A su vez, existen diferentes tipos de apolipoproteínas, denominadas con letras y números y que se originan en diversos tejidos, algunas exclusivamente en hígado, otras en intestino o de otras fuentes (Tabla 10.1).

Tabla 10.1

Apolipoproteína	HDL	LDL	IDL	VLDL	Q	Fuente	PM (kDa)
Apo A-I	100				x		
Apo A-II	100				x	Hígado/Int	
Apo A-IV					x		
Apo B-48					>70	Intestino	241
Apo B-100		88	6	>70		Hígado	512.7
Apo C-I	97		1	6			
Apo C-II	60		10	2		Hígado	
Apo C-III	60	10	10	30			
Apo D	100			20		Varias	
Apo E-II							
Apo E-III	50	10	20	20		Hígado	
Apo E-IV							

Composición (%) en apolipoproteínas en las diferentes LP.

Los Q y las VLDL, las partículas más grandes, son formadas en el enterocito y el hepatocito, respectivamente. Los Q son ensamblados con apo B-100 y apo A (A-I, A-II, and A-IV), contienen los ácidos grasos libres de la dieta en forma de TG y pasan a circulación vía el ducto torácico. Por otro lado, las VLDL, contienen apo B-100 (VLDL) y pequeñas cantidades de apo E y C e incluyen los TG en exceso de los hepatocitos. Las LDL y HDL son producidas en el torrente sanguíneo como consecuencia del metabolismo de las partículas grandes, Q y VLDL, contienen principalmente Colesterol esterificado (CE) en su centro.

Hay tres enzimas importantes en el transporte y metabolismo de las LP: Lipoprotein lipasa (LPL), Lipasa hepática (LH) y Lecitin colesterol acil transferasa (LCAT) (Tabla 10.2).

Tabla 10.2. Enzimas claves en el transporte de lípidos de LP

Enzima	PM (kDa)	Fuente	Sustratos
LPL	50.394	Tej Adiposo Mus. estriado	TG y PL de Q y VLDL grandes
LH	53.222	Hígado	TG y PL de VLDL pequeñas, IDL y HDL grande
LCAT	47.090	Hígado	C y PC de varias HDL

LPL, lipoprotein lipasa; LH, lipasa hepática; LCAT, lecitin colesterol acil transferasa; TG, triglicéridos; PL, fosfolípidos; C, colesterol; PC fosfatidil colina

LPL se expresa en varios tejidos pero principalmente en tejido adiposo y musculo estriado. Se sintetiza en las células parenquimales y de allí es secretada y anclada al endotelio capilar a través de heparan sulfato. Actúa hidrolizando los TG de las LP grandes y requiere para su acción la apolipoproteína C-II, que actúa como un co-factor. Es regulada por diversos factores, en tejido adiposo es estimulada por insulina y condiciones anabólicas; por el contrario, en el musculo su actividad es alta bajo condiciones catabólicas. Esta forma de regulación asegura el almacenamiento de TG en el tejido adiposo en el estado pos-prandial; mientras que en un estado pos-absortivo, se dispone de ácidos grasos para la contracción muscular.

La LH es similar a la LPL en que actúa unida a los proteoglicanos del endotelio vascular, luego de su síntesis y secreción del hepatocito. Participa en la lipólisis de VLD, Q remanentes e IDL y en la hidrólisis de PL y TG de las partículas de HDL. Su actividad aumenta en respuesta a los andrógenos y es inhibida por estrógenos.

La LCAT es sintetizada en el hígado y pasa a circulación, donde esterifica el colesterol libre de las HDL, usando ácidos grasos de fosfatidil colina (PC). El CE se transfiere a otras LP receptoras (principalmente LDL) vía la proteínas de transferencia de esteres de colesterol (CETP) y vuelve al hígado (transporte reverso de colesterol).

En el metabolismo de las LP podemos diferenciar tres rutas, una vía exógena, una endógena y la vía “reversa”.

Metabolismo Exógeno. Quilomicrones

Esta vía incluye el transporte de lípidos provenientes de la dieta, desde el intestino al músculo, tejidos adiposo e hígado (Fig. 10.3).

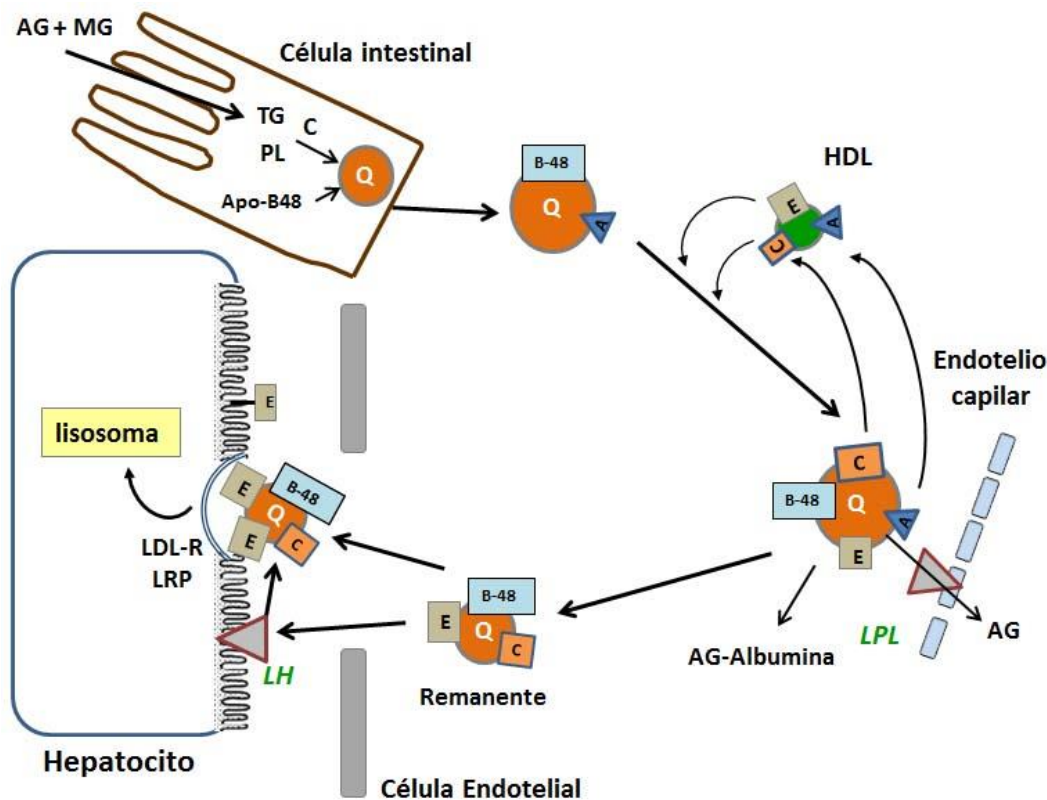


Figura 10.3. Vía exógena del metabolismo de Quilomicrones (Q). AG, ácidos grasos libres; MG, mono glicéridos; C, colesterol libres; PL, fosfolípidos; B-48, apo B-48; A, apo A; E, apo E; LDL-R, receptor de LDL; LRP, proteína relacionada con el LDL-R; LH, lipasa hepática; LPL, lipoprotein lipasa. Adaptado de Sanjurjo 2014

La grasa derivada de los alimentos se emulsiona por acción de los ácidos biliares e hidroliza produciendo ácidos grasos (AG) y monoacil glicerol (MG), por acción de la lipasa pancreática. Son absorbidos por las células de la mucosa intestinal y re-esterificados a TG y junto con CE, PL y apolipoproteínas (apo B-48 y apo A) así como vitaminas (E y otras liposolubles) dan origen a los Q, que eventualmente llegan a circulación. Allí reciben de las HDL las apo E y C-II, necesarias para su posterior metabolismo. En los capilares, la LPL hidroliza los TG liberando los AG que serán tomados por los adipocitos y células del músculo, dejando los Q remanentes, que son más pequeños ya que han perdido gran parte de los TG, así como cubierta de PL y apo A y C. Este “exceso” de cubierta dará origen a las HDL discoidales. Los Q remanentes se unen a la superficie del hepatocito (principalmente el receptor de LDL, LDLR, y la LH. Esta última continúa la hidrólisis de lípidos remanentes y la partícula puede adquirir más apo E, la cual se encuentra unida a los proteoglicanos presentes en la superficie de la célula. La partícula remanente es entonces tomada por el hepatocito a través de un proceso de endocitosis y degradada en los lisosomas, mientras que el colesterol libre puede metabolizarse en el hepatocito, incluyendo su excreción en bilis.

Metabolismo Endógeno

Mediante esta vía, los TG y CE hepáticos se transportan a los tejidos periféricos (Fig. 10.4).

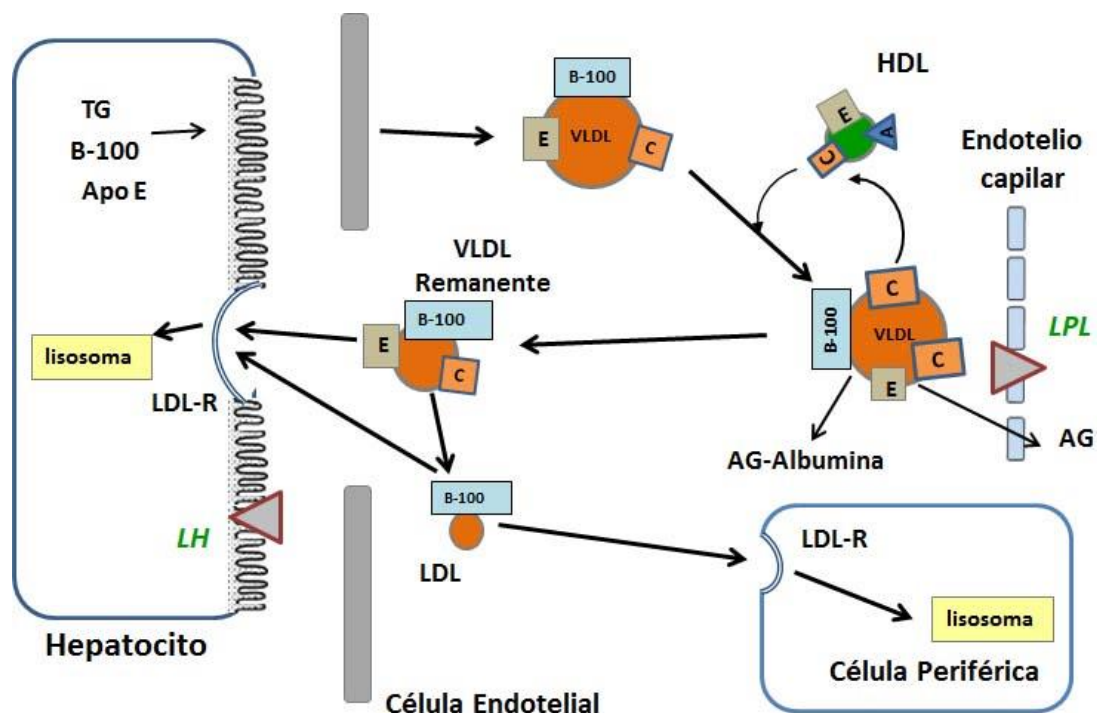


Figura 10.4. Vía endógena del metabolismo de VLDL. AG, ácidos grasos libres; MG, mono glicéridos; C, colesterol libres; PL, fosfolípidos; B-100, apo B-100; A, apo A; E, apo E; LDL-R, receptor de LDL; LH, lipasa hepática; LPL, lipo protein lipasa. Adaptado de Scriver 2001

En el hígado, se forman las VLDL que contienen los TG y CE en una cubierta de PL, C, apo B-100 y pequeñas cantidades de apo E y C y que son liberadas a circulación, donde intercambian PL, apolipoproteínas y CE con las HDL vía la acción de LCAT. Son hidrolizadas por LPL liberando AG, que se unen a la albumina para su transporte. Como consecuencia, se generan partículas más pequeñas, las VLDL remanentes. Los remanentes de VLDL se unen al LDLR que posee muy afinidad por apo E, son tomados por el hepatocito vía endocitosis y degradadas en los lisosomas. Los remanentes de VLDL de menor tamaño contienen muy poca apo E y así poseen menor afinidad por LDLR hepático, permanecen en circulación (entre ellos las IDL) siendo eventualmente degradadas por la LH para originar las LDL. Las LDL contienen muy poca apo E, casi exclusivamente apo B-100, lo que les permite unirse a receptores de LDL de forma monovalente, tanto en el hepatocito como en células extra-hepáticas. El CE se degrada a AG y C, este último regula negativamente la expresión superficial de LDLR e inhibe la actividad de hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), enzima regulatoria clave en la síntesis de mevalonato y colesterol.

Transporte reverso

Este metabolismo asegura la eliminación del exceso de colesterol no esterificado de los tejidos periféricos al hígado (Fig. 10.5).

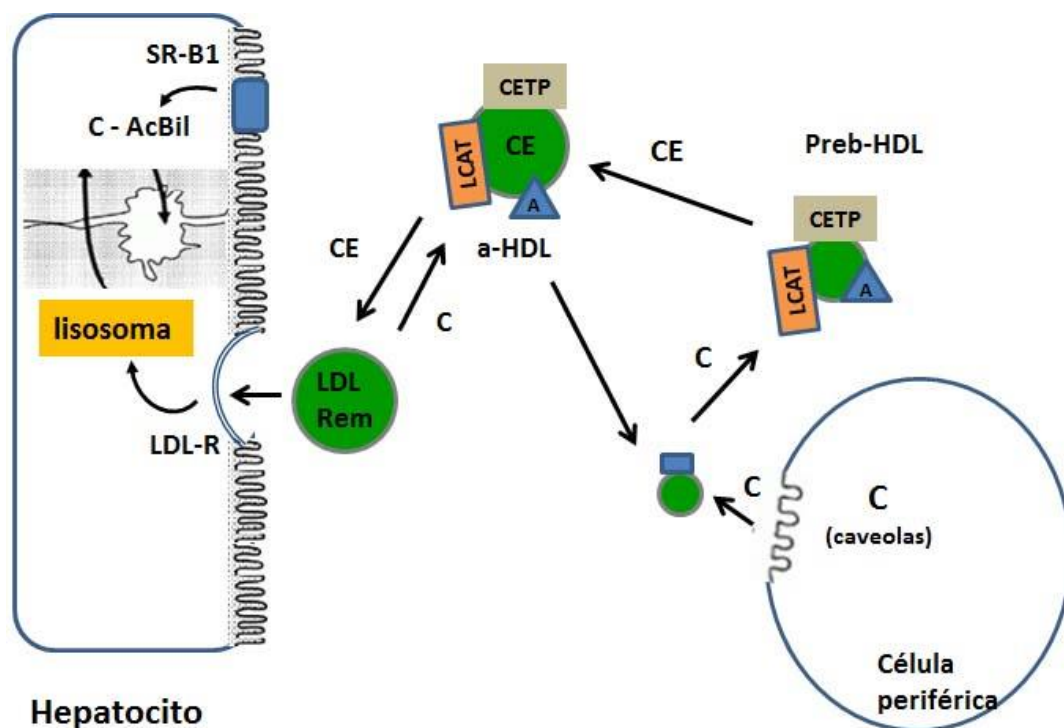


Figura 10.5. Transporte reverso de colesterol. SR-B1, receptor scavenger tipo B1; Ac Bil, ácidos biliares; LDL-R, receptor de LDL; Rem, remanentes; LCAT, lecitina-colesterol acil transferasa; CETP, proteína de transporte de ester de colesterol. Adaptado de Scriver 2001.

Las HDL se forman en circulación como consecuencia del metabolismo de los Q, VLDL o IDL. También pueden sintetizarse directamente como pre-β-HDL en el intestino, hígado o en los macrófagos. Son LP pequeñas discoidales, pobres en lípidos, que contienen apo A-I, PL y C, componentes provenientes de la superficie de células extra-hepáticas. Por acción de LCAT, el C es esterificado a CE que ahora pasa al interior de la HDL haciéndola más globular (α-HDL) y permitiendo la incorporación de más C desde los tejidos periféricos que será transportado a través de dos rutas al hígado.

En la primera de ellas, el CE se intercambia por C con las LDL circulantes y remanentes, por acción de CETP, haciendo a las HDL más pequeñas. Al mismo tiempo ocurre la hidrólisis de TG y PL de HDL por la LH, lo cual también reduce el tamaño de la partícula. En la segunda ruta, la HDL interacciona con el receptor *scavenger* B1 (SR-B1) hepático, que interviene en la captación selectiva del CE en estas LP. La acción conjunta de HL y la transferencia de CE y PL por CETP y PLTP desde las HDL a otras LP mantiene el flujo de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado. Este mecanismo, llamado transporte "reverso" de colesterol tiene como función transportar y eliminar el colesterol desde los tejidos periféricos al hígado

y permitir el intercambio de apolipoproteínas entre las diversas LP. Estas propiedades se complementan con otras importantes funciones “anti-aterogénicas” del HDL como son sus propiedades antioxidantes, eliminación de lípidos del espacio sub-endotelial, así como de moléculas de adhesión que podrían facilitar la unión y migración de monocitos-macrófagos al sub-endotelio, y su rol anti-agregante plaquetario.

Clasificación de Hiperlipoproteinemias

La clasificación clínica de los desórdenes asociados con hiperlipidemias e hiperlipoproteinemias se basan en los niveles plasmáticos de TG y C total y los niveles de C en las clases más importantes de LP (Fig. 10.6 y Tabla 10.3).

	Normal	Tipo I	Tipo IIa	Tipo IIb	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Colesterol (mg/dl)	160 - 290	No ↑	↑ o muy ↑	↑	No ↑	No ↑	No ↑
TG (mg/dl)	30 - 135	Muy ↑	N	↑	↑	↑	Muy ↑
Col / TG	2,1 – 5,3	0,2	1,5	variable	1,0 (0,3 - 2,0)	variable	0,15 – 6,0
Apariencia suero 4°C	Claro sin capa flotante	Claro con capa cremosa flotante	Claro	Ligeramente turbio	Turbio a veces con capa flotante	Turbio	Turbio con capa cremosa flotante
Riesgo ECV	Muy bajo	bajo	Muy alto	Muy alto	Muy alto	alto	bajo
Frecuencia		Muy raro	común	común	Relativamente raro	común	raro



Figura 10.6. Clasificación de las Hiperlipoproteinemias (Fredrickson).

Tabla 10.3. Desórdenes Hiperlipidemicos.

Designación y LP ↑	Sinónimo	Desorden Primario	Desorden Secundario
Hiperlipidemia Exógena (Q)	Tipo I	Deficiencia Familiar de LPL Déficit Familiar de apo C-II No clasificados	Disglobulinemias Sistémicas Lupus eritematoso
Hiperlipidemia Endógena (VLDL)	Tipo IV	Hipertrigliceridemia Familiar (moderada) Hiperlipidemia tipo-lipoproteínas múltiples fam. Hipertrigliceridemia Esporádica Enfermedad de Tangier	Disglobulinemias, Lupus Eritematoso Sistémico, Hiperlipemia Diabética, Glucogenosis tipo I, Lipodistrofias, Uremias, Hipopituitarismo, Síndrome nefrótico, DM, Alcoholismo, Uso de Estrógenos, de Corticoides, Estrés
Hiperlipemia Mixta (Q + VLDL)	Tipo V	Hipertrigliceridemia Familiar (severa) Deficiencia Familiar de LPL Déficit Familiar de apo C-II	
Hipercolesterolemia (LDL)	Tipo IIa	Hipercolesterolemia Familiar (defecto en LDLR) Hiperlipidemia tipo-lipoproteínas múltiples fam. Hipercolesterolemia Poligénica (incluye Hipercolesterolemia exógena)	Síndrome Nefrótico Hipotiroidismo Disglobulinemias Síndrome de Cushing Porfiria Intermitente Aguda (PIA)
Hiperlipemia Combinada (LDL + VLDL)	Tipo IIb	Hiperlipidemia tipo-lipoproteínas múltiples familiar No clasificadas	Síndrome Nefrótico Hipotiroidismo Disglobulinemias Síndrome de Cushing Uso de corticoides, Estrés
Hiperlipemia de Remanentes (β -VLDL)	Tipo III	Disbetalipoproteinemia Familiar No clasificadas	Hipotiroidismo Lupus Eritematoso Sistémico
Hiperlipoproteinemia Lamelar (LP vesicular y discoidal)		Deficiencia de LCAT Familiar	Cholestasis (con LP-X) Falla Hepática (con HDL lamelar)

Las alteraciones monogénicas solo dan cuenta de una fracción muy pequeña de las hiperlipoproteinemias primarias. La presencia de xantomas en piel o tendones puede ayudar muchas veces en el diagnóstico (Tabla 10.4), aunque en la mayoría de las enfermedades puede ser necesario realizar otras pruebas específicas (cantidades o estructura anormal de apolipoproteínas o alteraciones en enzimas relacionadas con el metabolismo de las LP) para confirmar el diagnóstico.

Tabla 10.4. Asociación de Xantomas con desordenes de Lipoproteínas

XANTOMA	Desorden Genético	Desorden Secundario
Eruptivo	Deficiencia Familiar de LPL Deficiencia de apolipoproteína C-II Inhibidor de LPL Familiar Hipertrigliceridemia Familiar (formas severas de, agravadas x alcohol, uso de estrógenos, o diabetes)	Hiperlipemia Diabética Colestasis Lipodistrofias Glucogenosis tipo I Gammopatías monoclonal
Tuberoeruptivo	Hipertrigliceridemia Familiar Disbetalipoproteinemia Familiar	Hipercolesterolemia Familiar Gammopatías monoclonal
Tuberoso	Disbetalipoproteinemia Familiar Hipercolesterolemia Familiar Fitosterolemia	Gammopatías monoclonal
Tendinoso	Hipercolesterolemia Familiar Apo B defectuosa Familiar Disbetalipoproteinemia Familiar Fitosterolemia Cerebrotendinous xanthomatosis	
Planar Palmer-digital creases Intertriginous Difuso	Disbetalipoproteinemia Familiar Hipercolesterolemia Familiar (homoc) Deficiencia de apolipoproteína A-I	Colestasis Gammopatías monoclonal
Subcutáneo	Hipercolesterolemia Familiar	Gammopatías monoclonal
Xantelasma	Hipercolesterolemia Familiar Apo B defectuosa Familiar Disbetalipoproteinemia Familiar	Gammopatías monoclonal
Corneal arcus	Hipercolesterolemia Familiar	
Tonsillar	Enfermedad de Tangier	

Aterosclerosis

La aterosclerosis, del griego “*atheros*” (pulpa o papilla) y “*skleros*” (endurecimiento), es la principal causa de muerte en la civilización occidental, definida como una enfermedad progresiva que se inicia en la infancia y que tiene manifestaciones clínicas en adultos maduros y de edad avanzada. Es un proceso multifactorial, asociado con otras patologías (diabetes hipertensión, tabaquismo, factores genéticos), aunque la mitad de los pacientes que sufren infarto de miocardio no presentan factores de riesgo. Por otro lado, la arterioesclerosis se refiere a un proceso de endurecimiento de la vasculatura general, con o sin calcificación, que compromete la expansión arterial, generando una sobre carga de presión y alteración de la perfusión coronaria.

Tradicionalmente se consideró a la aterosclerosis como un proceso basado en la acumulación de lípidos en la pared arterial, que progresivamente provoca una reducción del diámetro arterial luminal y consecuentemente del flujo coronario con un inadecuado aporte de oxígeno al miocardio. Se habla de las placas vulnerables, que presentan un alto contenido lipídico y una capa fibrosa adelgazada, cuya ruptura sería secundaria a causas de estrés mecánico.

Actualmente debe considerarse un proceso inflamatorio crónico de la pared arterial, en respuesta a diferentes formas de lesión o disfunción del endotelio. En el desarrollo del proceso aterosclerótico y en los eventos coronario agudos, la respuesta inflamatoria local y sistémica juegan un rol preponderante. Se cree que existiría una correlación entre la exposición del sistema inmunológico humano a enfermedades infecciosas y el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

Se ha sugerido también que las fuerzas hemodinámicas que fisiológicamente regulan la función de las células endoteliales, podrían jugar un papel importante en el origen de la lesión vascular. Esto está basado en la observación que las lesiones más tempranas en el proceso aterosclerótico no ocurren al azar en cualquier sitio de la vasculatura, sino en las ramificaciones y curvaturas arteriales, donde se encuentran perturbaciones en el flujo local. Se ha sugerido que esta situación induce una activación sostenida de la expresión local de una serie de genes aterogénico en las células endoteliales (MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas), lo cual llevaría a una localización preferencial de lesiones ateroscleróticas en el árbol arterial.

La enfermedad vascular aterosclerótica, que incluye la enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad arterial periférica, se asocia con varios factores de riesgo, aunque como se mencionó anteriormente, muchas de las personas que sufren eventos cardiovasculares no presentan ninguno de estos factores. De tal manera que hay un gran interés en identificar nuevos biomarcadores que ayuden a evaluar mejor el riesgo global de padecer algún evento cardiovascular. Así se han identificados nuevos marcadores (Fig. 10.7).

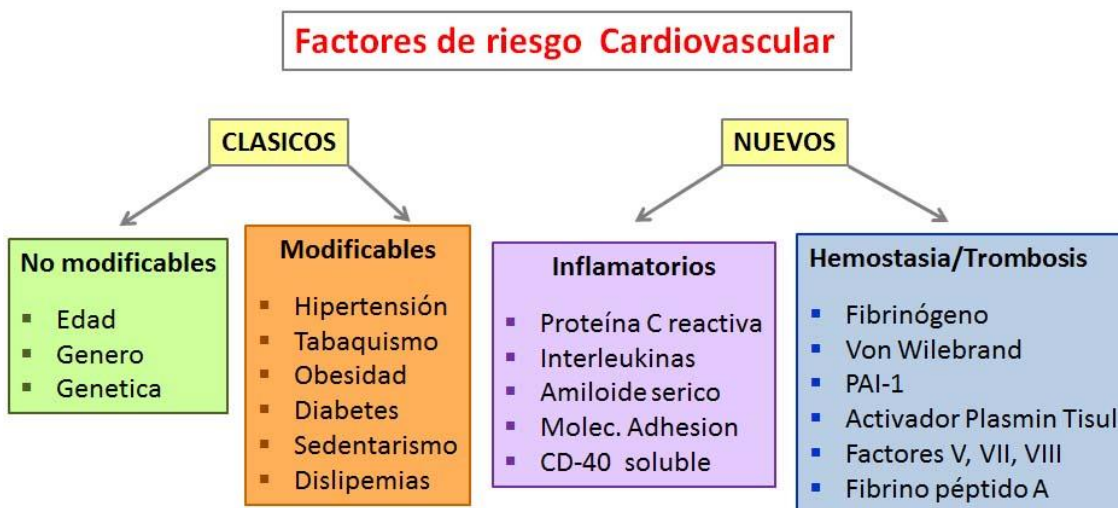


Figura 10.7. Factores de riesgos cardiovasculares clásicos y nuevos

Dentro de los factores de riesgo asociados a las Dislipemias, se considera la relación **ApoB : ApoA1** como un fuerte indicador de riesgo relacionado con las lipoproteínas aterogénico, en relación con las que serían de protección, como HDL. Otros factores o marcadores que se han investigado son la LDL pequeña densa, Lipoproteína(a), Lipoproteínas remanentes, LDL oxidadas, la proteína C reactiva de alta sensibilidad, homocisteína y fibrinógeno.

Proceso Aterogénico

La *aterogénesis* resulta de una serie compleja de eventos, en los que intervienen e interactúan varios factores circulantes y diferentes tipos de células, gatillados por la exposición crónica a factores aterogénicos, en los que los altos niveles de LDL juegan un rol determinante en la iniciación del proceso aterogénico.

En condiciones fisiológicas, el endotelio regula el tono vascular, el balance entre la trombosis y fibrinólisis y también el reclutamiento de células inflamatorias en la vasculatura. Estos efectos son mediados por diferentes moléculas (óxido nítrico, NO; prostaciclina (PGI₂), factor hiperpolarizante derivado de endotelio y endotelina-1). En particular el NO regula el tono vascular, la agregación plaquetaria, suprime la proliferación de las células de músculo liso vascular (CMLV) y boquea la adhesión y trans migración de leucocitos. Bajo circunstancias en que los niveles de LDL se encuentran crónicamente elevados, hay una reducción en la biodisponibilidad de NO, lo que se asocia con un aumento en la entrada de LDL a la íntima de la arteria (Figura 10.8). Además de los niveles circulantes, alteraciones en la composición y tamaños de LDL puede acelerar este proceso. La LDL en el subendotelio es retenida o atrapada por los proteoglicanos de la íntima, donde sufren diversos procesos de modificación química y estructural (oxidación, agregación) asociados con factores del entorno de la íntima (radicales libres, O₂⁻, hidrolasas, proteinasas, etc).

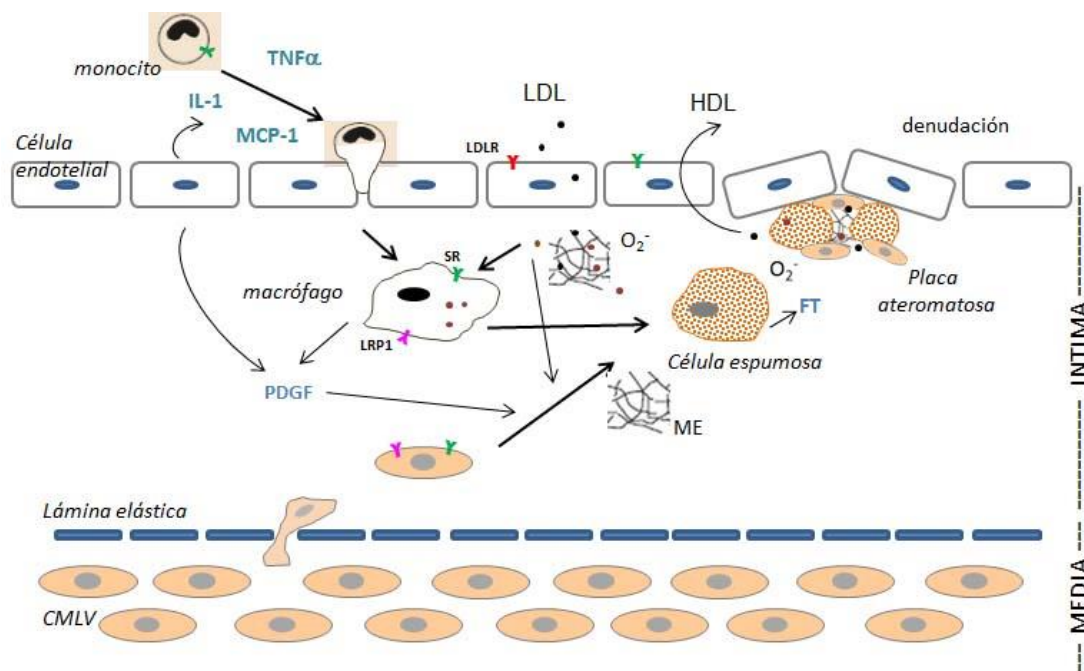


Figura 10.8. Esquema de representación del Proceso Aterogénico. TNF α , factor de necrosis tumoral α ; IL-1, interleuquina 1; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos 1; LDLR, receptor de LDL; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; SR, receptor scavenger; LRP1, proteína similar al receptor de LDL; FT, factor tisular; ME, matriz extracelular; CMLV, células de músculo liso vascular; $\color{red}{Y}$, LDLR; $\color{green}{Y}$, SR; $\color{purple}{Y}$, LRP-1. Adaptado de Martínez-González et al., 2001.

Hay dos tipos de receptores asociados con la captación de las LDL por células de la pared vascular, la familia de **receptores de LDL** (LDL-R) y los receptores **scavengers** o basureros. Los LDL-R reconocen las partículas que contienen apo-B y apo-E, es el receptor clásico de LDL. Otro miembro de esta familia es LPR-1, que reconoce varios ligandos, entre ellos VLDL-enriquecida en apo-E, lipoprotein lipasa, complejos de lipoproteínas ticas en TG-LPL y Lp(a). LPR-1, al igual que LDL-R es regulada negativamente por altos niveles de colesterol, se expresa en macrófagos y CMLV. La familia de receptores **scavengers** (SR) reconocen una amplia variedad de sustratos (LDL ox, células apoptóticas, patógenos, etc.) y juegan un rol importante en la formación de la formación de las células espumosas y lesión vascular. Estos receptores se expresan en células endoteliales, monocitos/macrófagos, plaquetas, adipocitos y CMLV. El receptor **scavenger** no es regulado por los niveles intracelulares de colesterol, de tal manera que permite la captación ilimitada de LDL modificada en su interior, dando lugar a la formación de las células espumosas.

Otro evento temprano en el desarrollo de la lesión, es la adherencia y trans migración de los monocitos circulantes al espacio de la íntima, en áreas de pre-lesión. Esto ocurre debido a la liberación desde el endotelio, de citoquinas quimio-atractivas (MCP-1, IL-8, IL-1, TNF α) inducida por las LDL modificadas. Además, hay un aumento en la expresión de moléculas de adhesión (integrinas, selectinas) sobre la superficie de las células endoteliales. Estos cambios inducen el reclutamiento, adhesión y transitis (a través del espacio entre células endoteliales) de monocitos, los que en el espacio subendotelial se convierten en macrófagos, acumulan esteres de colesterol vía receptores **scavengers** (SR) y se transforman en células espumosas (originando la

estría grasa). Estas células ejercen un efecto tóxico, liberando citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, factor tisular, interferón y ROS (O_2^-) que aumentan el estímulo a la adhesión de monocitos en el endotelio, exaltan la replicación de macrófagos y de CMLV en la íntima.

En la capa media vascular se encuentran las CMLV, caracterizadas por su capacidad contráctil (fenotipo contráctil) en la vasculatura sana. Sin embargo, bajo estímulos aterogénicos (PDGF y agentes quimiotácticos), sufren cambios fenotípicos: migran a la capa íntima y proliferan (fenotipo proliferativo), captan lípidos modificados y se transforman en células espumosas. Además son capaces de sintetizar componentes de matriz extracelular de tejido conjuntivo (colágeno, elastina, glucoproteínas y proteoglicanos). Se ha demostrado que las células espumosas liberan factor tisular (FT), aumentando la susceptibilidad de la placa a la formación de trombos.

No obstante, todas las estrías grasas no progresan hacia placas ateroscleróticas maduras, sino que esto dependerá del balance entre los factores aterogénicos y los procesos de remoción del colesterol de la íntima (vía HDL), la capacidad de reparación del endotelio y la regulación de la proliferación de miocitos. Cuando este balance se pierde, la placa aterosclerótica progresa porque continúa la proliferación de las CMLV, síntesis de matriz extracelular, contribuyendo a la mayor parte de la cubierta fibrosa de la lesión. La proliferación de las CMLV es regulada por varios factores (Tablas 10.5).

Tabla 10.5. Factores que regulan la proliferación de CMLV

<i>Estimulantes</i>	PDGF, MDGF, FGF α , FGF β , Endotelina, Insulina, IGF-1, LDL, Interferón, IL-1, Hormona de crecimiento
<i>Inhibidores</i>	Productos heparina-simil de células endoteliales, Heparina, Proteoglicanos de heparan sulfato
<i>Reguladores de síntesis de matriz</i>	TGF β , TGF α , TNF α , Cadenas A y B de PDGF, fuerzas hemodinámicas, lípidos extracelulares

Eventualmente las células espumosas sobrecargadas de lípidos modificados y con alto contenido de ROS, sufren un proceso de necrosis celular y ocurre la trombosis mural. Los lípidos liberados en el proceso necrótico contribuyen al centro necrótico de la placa y generan una reacción inflamatoria granulomatosa. Las enzimas lisosomales liberadas también en este proceso, modifican la lesión del endotelio, lesionan células vecinas y puede llegar a producirse denudación del endotelio. En estos sitios, habrá adhesión y agregación plaquetaria, las que producen factores de crecimiento que inducen la migración de CMLV a la íntima. La placa aterosclerótica madura principalmente como una lesión de la íntima, sin embargo, casi siempre se observa un adelgazamiento de la media, debajo de la porción más gruesa de la placa. También se han descrito cambios en la adventicia: neovascularización, fibrosis e infiltración de linfocitos.

Los depósitos de colesterol intracelular en la lesión pueden ser removidos por acción de las HDL. Tanto los macrófagos como las CMLV expresan un receptor específico para HDL (SR-B1), que es regulado por la concentración intracelular de colesterol. Cuando los niveles de colesterol aumentan, el número de receptores de HDL también aumenta, interacciona con HDL e intercambia colesterol, extrayéndolo de la CMLV y macrófagos vía el transportador ABCA-1 (ATP)-*binding cassette transporter A-1*). En este proceso, el colesterol asociado a HDL es llevado al hígado (transporte reverso de colesterol), proceso facilitado por las proteínas de transferencia de esteres de colesterol (CETP) para ser eliminado del organismo. Por otro lado, las partículas de HDL pueden prevenir la formación de LDL oxidada debido a su alto contenido de componentes y enzimas antioxidantes. HDL ejerce también un efecto anti-inflamatorio, inhibiendo la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio; y es capaz de estimular la reparación celular, estimulando el reclutamiento de células progenitoras endoteliales.

Es claro que los altos niveles de HDL son beneficiosos para proteger y disminuir el riesgo cardiovascular. En este sentido, existen estrategias no farmacológicas así como intervenciones farmacológicas para elevar los niveles de HDL. (Tabla 10.6). En los últimos años, el conocimiento de las bases biológicas de la HDL ha permitido diseñar nuevos blancos terapéuticos para potencialmente elevar los niveles y/o mejoran la función de la HDL.

Tabla 10.6. Estrategias basadas en HDL

Aprobadas	No Farmacológicas	Dieta saludable Ejercicio Eliminación del tabaquismo Eliminación del alcoholismo
	Farmacológicas	Estatinas – Niacinas – Fibratos - Tiazolidionas
Nuevas	Funcionalidad de HDL	Agentes tipo Probucol (antioxidantes)
	Metabolismo de HDL	Sobre-expresión del SR-B1 Sobre-expresión del gen ABCA-1 Inhibidores de CETP Inhibidores de Lipasa endotelial Activadores de LCAT
	Composición de HDL	Reinfusión de HDL de-lipidado <i>ex vivo</i>
	Aumento de apoA1	Infusión i.v. de apo A1 HDL reconstituida Agonistas de LXR/RXR Agonista transcripcional de apo A1 oral

Referencias

- Badimon L, Vilahur G. LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Apr;1254:18-32.
- Martínez-González J, Llorente-Cortés V, Badimon L. Cellular and molecular biology of atherosclerotic lesions]. *Rev Esp Cardiol.* 2001 Feb;54(2):218-31.
- Scriver CR et al. (Eds). *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* McGraw Hill, 2002.

CAPÍTULO 11

Hiperquilomicronemias

Ana Maria Cortizo

Introducción

La “Quilomicronemia” se puede definir como la presencia de partículas grandes en el plasma que derivan de una dieta grasa. El síndrome de Quilomicronemia puede deberse a diferentes causas, caracterizadas por Hipertrigliceridemia. Los pacientes con quilomicronemia en ayunas, pueden presentar un patrón Tipo I (solo aumento de Q) o Tipo V (aumento de Q y VLDL) y las causas pueden ser de origen familiar o también pueden existir formas adquiridas de síndrome de Quilomicronemia.

Luego de una comida, los Q parecen en circulación, pero son rápidamente eliminados, de tal manera que luego de un ayuno de 10-12h no se detectan en el plasma. Esto ocurre a través del metabolismo exógeno (Cap 10) y gracias a la acción de una serie de enzimas que participan en el mismo.

Familia de Lipasas

En los vertebrados, las lipasas constituyen una familia que incluyen: Lipoprotein Lipasa (LPL), Lipasa Hepática (LH) y Lipasa Pancreática (LP). Cada una codificada por un gen particular, con homología de secuencias y que derivan de un gen ancestral común. Estas lipasas presentan algunas importantes características estructurales y funcionales compartidas. Presentan la triada catalítica Ser-Asp-His, necesaria para su actividad enzimática y un tramo de 9 aminoácidos alrededor de la Ser en dicha triada. También presentan una serie de cisteínas, que están comprometidas en puentes –S-S-, altamente conservados en la región central de la molécula lipasa y sitios de N-glicosilación compartidos por la LPL y LH. Estas dos lipasas se unen a los proteoglicanos de heparán sulfato de la superficie celular. Presentan dos dominios: un dominio Nt- donde se encuentra la triada catalítica y un dominio Ct- con la especificidad de sustrato, la de unión a heparán sulfato y la de unión a apoCII. Un dominio estructural importante (“tapa”) define la especificidad de sustrato, mientras que en la LPL se favorece la hidrólisis de TG, en la LH, la hidrólisis de PL se ve favorecida.

Lipoprotein Lipasa

- LPL es una glicoproteína ubicada en la superficie luminal de las células endoteliales de los capilares.

- El gen de LPL (*LPL*), de 30 kb está localizado en el cromosoma 8p22

- La producción de LPL es regulada a nivel transcripcional, postranscripcional y pos-traducciona

- El mRNA se expresa en diferentes tejidos: esta enzima o una similar estaría presente en tejido adiposo, corazón, músculo esquelético, pulmón y en la glándula mamaria lactante

- LPL se encuentra unida al endotelio capilar por heparán sulfato

- LPL puede ser desplazada de su unión al endotelio por administración de heparina i.v. y se detectada en plasma

- La forma activa de LPL es un dímero en equilibrio con monómero

- Sustratos: TG, MG; lecitina, hidroliza enlaces 1- y 3-ester en TG generando 2-monoglicéridos que se isomerizan a 1-monoglicéridos y se siguen hidrolizando

- Síntesis de LPL: en tejido adiposo, músculo esquelético y cardíaco, macrófagos y células de Kupffer. Es transportada hacia heparán sulfato del endotelio. En el RER sufre un procesamiento de glicosilación y exocitosis. La glicosilación es crítica para la secreción de la enzima activa y ocurre en dos sitios: Asn 43 y Asn 359. La síntesis es regulada por control nutricional y hormonal (insulina).

La LPL juega un rol fundamental en el **procesamiento de Q y VLDL**, como ya describimos en el Cap 10. Lleva a cabo importantes funciones en el metabolismo de las LP, regulando la distribución de energía en forma de ácidos grasos libres y la distribución de colesterol entre LDL y HDL.

Para la actividad de LPL se requiere un cofactor: **apolipoproteínas C-II**, la cual posee determinadas características que se resumen a continuación.

- El gen de apo C-II (*APOCII*) se ubica en el cromosoma 19, igual que los de apo E y apo C-I. La similitud con los genes de otras apolipoproteínas ubicadas en cromosoma 11, sugiere un ancestro común.

- Síntesis hepática- intestino: Se sintetiza como pre-apo CII. La pro-apo CII sufre modificaciones pos-traduccionales (glicosilación).

- Posee un dominio de unión a LPL y un sitio de unión a VLDL y QM

- La apo C-II se encuentra en HDL y es transferida a QM y VLDL nacientes

- Funciona como un co-factor activando la LPL

- Apo C-II se encuentra en exceso en plasma y se cree que se requiere sólo el 10 % de los valores normales para una actividad máxima de LPL

Existen diversos factores que actúan como inhibidores o activadores de la LPL:

- Apo C-II (intercambio con HDLs)

- Apo C-III inhibe lipólisis mediada por LPL desplazando apoCII
- Apo A-V se expresa únicamente en el hígado, se asocia a HDL y regula los niveles de TG (TG de VLDL)
- Angiopoetinas inhiben LPL in vitro, se asocia a TG en ratones diabéticos
- VLDLr promueve la internalización de lipoproteínas en células endoteliales, donde actúa la LPL
- LMF1 (lipase maturation factor), maduración y transporte de LPL activa en ER
- GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL binding protein), transporta LPL del espacio subendotelial hacia el lumen del capilar

Síndrome de Quilomicronemias

Podemos definir el Síndrome de Quilomicronemia como la presencia de uno o más síntomas o signos que aparezcan en pacientes con niveles de TG ≥ 2000 mg/dl.

- Normalmente no hay Q en plasma en ayunas ($t_{1/2}$: 10 -12 hs).
- Quilomicronemia: se define cuando los niveles de Q en plasma en ayunas se asocian con valores de TG 1000 - 2000 mg/dl)
- Generalmente los síntomas se observan a valores más altos
- Se han dividido a los individuos con Quilomicronemia arbitrariamente en tipo I (VLDL normal) y tipo V (VLDL)
- Puede haber Quilomicronemias secundarias a otros desórdenes: diabetes mellitus no tratada, terapia con estrógenos o antihipertensivos, abuso de alcohol

En realidad, las hipertrigliceridemias severas, raramente se representan como un desorden monogénico simple con una herencia Mendeliana, frecuentemente expresada en la niñez como consecuencia de mutaciones génicas homocigotas o heterocigotas compuesto. Por el contrario, comúnmente las trigliceridemias se desarrollan tardíamente en la vida sobre un *background* de variantes génicas combinadas con factores del entorno (dietarios) y estresores metabólicos (medicamentos, diabetes, síndrome metabólico). Los nuevos conceptos actuales han cambiado la antigua clasificación de Frederickson a una basada en las alteraciones genéticas moleculares. Dentro de las hipertrigliceridemias monogénicas, muy poco frecuentes (1:1.000.000), las más importantes se deben a defectos en el gen *LPL* o *APOCII*.

Características Clínicas. Se caracteriza por la aparición de una tríada: dolor abdominal, Hipertrigliceridemia y pancreatitis.

- *Xantomas eruptivos*: son depósitos de lípidos en la piel, que resultan de la fagocitosis de Q por macrófagos en la piel. Son lesiones que reflejan una quilomicronemia crónica. Aparecen en nalgas, rodillas, superficies extensoras de los brazos, y pueden hacerse generalizados. Son pequeñas lesiones papulares amarillentas. Si los Q bajan, estas lesiones revierten en el término de semanas a meses.

- *Lipemia retinalis*: es una lesión que aparece cuando los niveles de TG > 4000 mg/dl, puede detectarse con un fondo de ojo. Las arteriolas y vénulas retinales desarrollan un color rosa pálido, que se debe a la dispersión de luz de los Q, y que puede revertir con los niveles de Q.

Los altos niveles de TG en plasma pueden interferir con las medidas de otros analitos (amílase, hemoglobina, bilirrubina). La presencia de Q en plasma en ayunas está frecuentemente relacionado con el nivel de TG. Cuando el plasma tiene < 1000 mg/dl TG, usualmente no tiene Q; pero cuando los niveles plasmáticos de TG son > 1500 mg/dl, generalmente contiene QM.

A simple vista del plasma o suero se puede estimar la cantidad de TG comparando con leche

Leche 4 %: 4000 mg/dl

2 %: 2500 mg/dl

1 %: 1500 mg/dl

Leche descremada 1000 mg/dl

Deficiencia de LPL

En 1932, Burger y Grutz describieron por primera vez en niño con una forma familiar de hiperquilomiconemia, que presentaba xantomas eruptivos, hepatomegalia y un plasma lechoso, hijo de padres primos entre sí. La apariencia del plasma cambiaba cuando se sometía al paciente a una dieta libre de grasas. En 1960, Havel y Gordon describieron la causa de esta enfermedad como una disminución de la actividad de LPL. También se reportó la ausencia de apo CII como otra causa de hiperquilomiconemia familiar. En 1974, Krauss et al. diferenciaron las actividades de lipasa pos heparina como LPL y LH. En 1989, se descubrió de uno de los defectos estructurales del gen de LPL, actualmente se han descrito aproximadamente 100 mutaciones asociadas con un fenotipo clínico.

Fenotipo Clínico: esta enfermedad se manifiesta en la niñez, en general antes del primer año de vida. Se presenta con **dolor abdominal** que irradia hasta la espalda, similar a un abdomen agudo. Se puede manifestar **pancreatitis** a edad mediana. Los pacientes aprenden solos a evitar comidas con alto contenido graso. Puede haber **hepato – esplenomegalia**, debido a los macrófagos que incorporan TG y forman células espumosas. Es frecuente la presencia de **Xantomas eruptivos**, cuando los niveles de TG > 2000 mg/dl y en general los pacientes no presentan predisposición por aterosclerosis.

Genética: la deficiencia de LPL es una alteración muy rara (1: 10⁶), aunque la prevalencia de los homocigotas para mutaciones de LPL puede ser más alta (200: 10⁶), en poblaciones con alta consanguineidad como en ciertas zonas de Québec, Canadá. Se transmite como un rasgo AR. Se han descrito mayormente mutaciones de sentido erróneo (*missense*). La mayoría ocurre en la zona central del gen, altamente conservada (sitio catalítico), lo que se asocia con una marcada

reducción o ausencia de actividad LPL. Existen también sustituciones que producen codones de stop (*nonsense*), deleciones, inserciones y mutaciones en sitios de *splicing*, lo cual lleva a una LPL ausente o con defecto en sitio catalítico.

Patofisiología: los pacientes presentan típicamente un plasma opalescente por acumulación de QM ricos en TG. La gravedad del cuadro está asociada con los niveles de AG de cadena larga que se ingieren con la dieta, es decir esta es una HIPERTRIGLICERIDEMIA EXOGENA. Se sabe también que existen factores adicionales a la deficiencia de LPL que determinan el aumento o no de las VLDL plasmáticas. Como consecuencia de la falla en LPL, el metabolismo y composición de LDL y HDL está alterado

En pacientes con quilomicronemia desde la niñez, la actividad de LPL es baja o nula en todos los tejidos. Sin embargo, se han descrito variantes que presentan cierta inmunoreactividad de LPL en plasma pos heparina, y otro que no expresan LPL plasmática pero con actividad LPL normal en TA.

Los padres de los pacientes, **heterocigotas obligados** para la mutación de LPL, tienen $\frac{1}{2}$ de actividad LPL normal, son asintomáticos o con niveles de TG ligeramente aumentados.

Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico debe considerarse frente a un síndrome quilomicronémico, en particular si no existe aumento de VLDL (infranadante claro) y en ausencia de causas secundarias de hipertrigliceridemia (diabetes, alcohol, terapia con estrógenos, agentes antihipertensivos, desórdenes paraproteinémicos).

Un *diagnóstico presuntivo* puede hacerse si los niveles de TG disminuyen después de una semana de restricción dietaria de AG de cadena larga.

Diagnóstico confirmatorio: determinando la actividad LPL en plasma post-heparínico o en TA (la ventaja en este último caso es que no hay LH). Para separar la actividad de LH, pueden usarse anticuerpos específicos, sulfato de protamina, o un buffer con alta fuerza iónica para inhibir la actividad LPL. Además, es necesario diferenciar si hay defecto enzimático de LPL o ausencia del cofactor apoCII o la presencia de algún inhibidor para LPL.

El *tratamiento* de estos pacientes consiste en la restricción dietaria de AG de cadena larga saturados y no saturados. Se puede reemplazar por AG cadena media y corta, que son absorbidos vía porta y no se incorporan a los TG de los quilomicrones. También es importante evitar agentes exógenos que aumentan TG: evitar el alcohol, estrógenos, diuréticos, agentes bloqueantes β -adrenérgicos. Actualmente se llevan a cabo investigaciones para determinar las posibilidades de una terapia de reemplazo génica, lo cual se probó en ratones.

Deficiencia familiar de APOC-II

En 1978, Breckenridge et al describieron un individuo masculino de 59 años con TG 4000mg/dl, y ausencia de actividad de LPL pos-heparina, presentaba dolor abdominal recurrente desde los 18 años y desarrollo diabetes melitus y esteatorrea. Después de una restricción dietaria sus niveles de TG cayeron de 4000 a 1000 mg/dL. Se observó una marcada reducción de TG luego de una transfusión (por anemia) sugiriendo que en el plasma había algún componente para el cual el era deficiente, y que posteriormente se demostró que era un defecto en apo CII. La presencia de niveles alterados (50% del valor normal) en los parientes del paciente establece la naturaleza familiar del defecto.

Los pacientes presentan **características clínicas** similares al déficit de LPL, con manifestaciones en la edad adulta. El retardo en la aparición de los síntomas y la mayor tolerancia a las dietas grasas pueden estar relacionadas a un defecto menos severo en el *clearance* de Q y VLDL, dado que existe LPL actividad residual. La presencia de Xantomas eruptivos y hepatoesplenomegalia es menos frecuentes que en el caso de déficit de LPL. Por otro lado es más común la pancreatitis (ataques recurrentes) y los pacientes con defectos en apo C-II presentan principalmente un patrón con aumento de QM y VLDL, disminución de LDL y HDL.

Genética: la enfermedad se expresa como un rasgo AR y es muy rara. Se presenta con distribución étnica amplia y asociada a consanguineidad.

Se han descrito alrededor de 10 defectos estructurales en el gen de apo CII que producen ausencia de la proteína o una proteína defectuosa. Hay sustituciones de bases que producen codones de *stop*, o en el codón de inicio. Individuos heterocigotas para el defecto, tienen niveles normales de lípidos.

Diagnóstico y Tratamiento

La deficiencia de LPL puede ser corregida por adición de apo C-II al ensayo de actividad de LPL, lo cual confirma el diagnóstico.

También se puede usar una fuente de LPL tal como LPL de leche bovina o plasma pos-heparina de *guinea pig* que no contienen apo C-II, para evaluar el plasma de un paciente con deficiencia potencial de apo C-II. Se puede titular la cantidad de apo C-II necesaria para corregir la actividad de LPL. Es posible evaluar el déficit de apo C-II por electroforesis de apolipoproteínas de VLDL y Quilomicrones en gel bidimensional.

El tratamiento es el mismo que para los pacientes con déficit de LPL.

Inhibidor de Lipoprotein Lipasa Familiar

Se han descrito casos de Síndrome de quilomicronemia y disminución de LPL pos-heparina, con LPL de tejido adiposo aumentada y apo C-II normal o aumentada. La Quilomicronemia se presentó 3 generaciones de la familia, siguiendo un patrón A-D. Se descubrió que en el plasma

existe un inhibidor de LPL, capaz de inhibir la actividad LPL del tejido adiposo y del plasma pos-heparina de sujetos normales. Este inhibidor, de naturaleza desconocida, es no dializable, estable al calor, sensible a repetidas congelaciones / descongelaciones y está presente en una fracción de no lipoproteínas plasmáticas.

Desórdenes relacionados con Quilomicronemia

Hiperlipoproteinemia tipo V: representan un grupo altamente diverso de desórdenes primarios y secundarios con hipertrigliceridemia moderada a severa, con aumento de VLDL. Los individuos con hipertrigliceridemia familiar monogénica presentan moderada hipertrigliceridemia con quilomicrones en plasma (prueba de la heladera) (Tipo V) o no (Tipo IV).

Clínica – Patología. Se caracteriza por una combinación de anomalía familiar primaria y adquirida secundaria. Es un defecto familiar, ya que se detecta hipertrigliceridemia en familiares del probando. Se han descrito dos desórdenes genéticos:

- Hiperlipidemia combinada familiar
- Hipertrigliceridemia familiar monogénica

Se observa comúnmente en el síndrome de quilomicronemia, también se ve ocasionalmente disbetalipoproteinemia.

La prevalencia e incidencia de la hipertrigliceridemia masiva es más común en clínicas de Diabetes y en hospitales establecidos para la prevención del alcoholismo.

Tratamiento. Todas las manifestaciones clínicas del síndrome de quilomicronemia son reversibles con la reducción de los TG plasmáticos. El tratamiento de la hipertrigliceridemia en los pacientes más comunes, con desórdenes familiares concomitantes y adquiridos, debe ser dirigido primero hacia el desorden adquirido. El *ácido nicotínico* debe ser usado con precaución en pacientes con diabetes dado que es un hiperglucemiante. En general, una hipertrigliceridemia marcada que no responde a una dieta baja en grasas y/o al tratamiento de la enfermedad adquirida es una indicación para el uso de *clofibratos* en el programa de tratamiento.

Hiperlipidemia tipo III

Desorden hereditario en el que el colesterol y los TG se encuentran elevados en el plasma sanguíneo y predispone a los individuos afectados al desarrollo de aterosclerosis prematura.

Una característica bioquímica del desorden es la aparición de una VLDL que migra en posición β (β -VLDL), que son remanentes enriquecidos en colesterol de Q intestinales y VLDL hepáticas. Estas β -VLDL se hallan enriquecidas en una forma variante de apo E, que en los individuos con hiperlipoproteinemia tipo III es disfuncional. Se encontró una anomalía en la apo E: un aumento absoluto en la apo E (apo LP rica en Arg). La apo E constituye el ligando mayoritario

para los receptores de LDL y es la responsable de la captación celular de los quilomicrones y VLDL remanentes. Aparece una forma mutante de apo E, la E2, diferentes de la isoforma normal o apo E3. Se encontró que la apo E mutante no se une normalmente a los receptores de lipoproteínas (LP). Sin embargo, la expresión de hiperlipidemia en sujetos con apo E mutante es modulada por otros factores genéticos y del entorno.

Este desorden fue descrito por primera vez por Gofman (1950) por la presencia de “Xantoma tuberoso” basado en lesiones xantomatosas de la piel sobre tendones extensores y en la superficie de la mano. Se la considera también como la “Enfermedad de remoción de remanentes” y se presenta con una frecuencia de 1-5 : 5000 de la población general y herencia (forma más frecuente) AR.

Características bioquímicas del desorden

El defecto bioquímico más importante es la β -VLDL y una apo E mutante.

- Colesterol plasmático > 300 mg/dl - hasta 1000 mg/dl (VN: 210 - 217, 30-50 años)
- Triglicéridos plasmáticos > 300 mg/dl
- Col / TG \cong 1

El diagnóstico de hiperlipidemia tipo III debe ser considerado en individuos hiperlipidémicos cuando los niveles de Col y TG están elevados y aproximadamente iguales. Se puede determinar por ultracentrifugación y electroforesis de lipoproteínas que aparece una banda β (β -VLDL), $d < 1.006$ g/ml), con un aumento absoluto en las LP de esta fracción, un aumento modesto en IDL (d 1.006 - 1.019 g/ml), disminución en LDL y una modesta disminución en HDL.

En el plasma aparecen LP anormales: se acumula una β -VLDL, remanentes derivados de quilomicrones del intestino (apo B48) y VLDL hepáticas (B-100). Los Q son metabolizados por LPL a Q remanentes, y estos removidos por el hígado a través del receptor de apo E (Fig 10.3). Las VLDL también son metabolizadas vía LPL a VLDL remanentes, parte pasa a IDL y LDL y un 50% son removidas por el hígado vía el receptor de apo E (Fig 10.4). Las partículas de β -VLDL presentan una composición diferente las pre β -VLDL normales: se encuentran enriquecidas en colesterol (principalmente como ester de colesterol), son deplecionadas en TG, contienen menor cantidad de apo C y se caracterizan por contener un aumento en apo E. La apo E presente representa una variante no funcional en términos de su capacidad para unirse a los receptores de superficie celular específicos. La fracción de IDL también es anormal y contiene algo de apo B-48.

Características clínicas

La variante común asociada con la Hiperlipoproteinemia tipo III es apo E-2, con un aminoácido Cys en lugar de Arg en la posición 158 (Arg158→Cys).

Aproximadamente el 1 % de los norteamericanos y europeos del norte son homocigotas para esta variante de apo E (fenotipo E-2/2), que está asociado con la Hiperlipoproteinemia tipo III, presentando la β -VLDL que se detecta en el plasma (Disbetalipoproteinemia). A estos individuos se los clasifica como Disbetalipoproteinémicos porque tienen la β -VLDL y la predisposición genética. Pero la mayoría de estos individuos no presentan una hiperlipidemia general (Hiperlipidemia tipo III), que es muy rara y se expresa con una frecuencia de 1-5 : 5000 en la población general.

La discrepancia entre la aparición de la forma variante de apo E (1:100) y la expresión de la hiperlipoproteinemia tipo III (1-5:5000), indica que el desorden es modulado por otros factores genéticos y del entorno que afectan los niveles absolutos de lípidos plasmáticos, con rangos de hipo - hiperlipidémicos.

La edad de expresión clínica de esta enfermedad (hiperlipidemia tipo III) en individuos homocigotas apo E-2/E-2 es en la **edad adulta**. La mayor prevalencia se observa en hombre y a más temprana edad que en las mujeres. Usualmente las mujeres la expresan después de la menopausia. Puede presentarse en algunos casos más tempranamente, lo cual se asocia a otras enfermedades como la Diabetes mellitus, el hipotiroidismo o la obesidad.

Los **xantomas** son patognomónicos de esta enfermedad: *xantoma striata palmaris*: que representan depósitos de lípidos amarillentos en los pliegues palmares, también se llaman xantomas planares o palmares. Aproximadamente la mitad de los pacientes no tratados presentan esta lesión. Existen otros tipos, como los xantomas tuberosis o tuberoeruptivos, pero estos no son patognomónicos de esta patología. Los xantomas normalmente desaparecen rápidamente con el tratamiento.

La Hiperlipidemia tipo III se asocia con **aterosclerosis prematura o acelerada**. La enfermedad vascular se presenta en 1/3 - 1/2 de los individuos afectados, con una distribución inusual: involucra las extremidades inferiores tan frecuentemente como la enfermedad arterial coronaria. Esta característica es muy diferente de lo que ocurre en la hipercolesterolemia, donde mayormente la afectación es coronaria. La enfermedad vascular generalmente se presenta más tempranamente en hombres (40 años) que en mujeres (50 años). La Hiperlipidemia tipo III totalmente expresada se asocia con un alto riesgo de enfermedad vascular prematura.

Se han descrito también una serie de **desórdenes asociados** con la Hiperlipidemia tipo III, lo cual sugiere que su presencia puede exacerbar la hiperlipidemia.

- Hiperuricemia asintomática: en aproximadamente la 1/2 de los pacientes, aunque sólo el 4 % desarrollan gota clínica.
- Intolerancia a la glucosa: sólo el 4 % tiene Diabetes mellitus clínica
- Obesidad
- Hipotiroidismo (asociado con un aumento en el colesterol)
- Hipertiroidismo (disminuye la hiperlipidemia)

De reportes de necrosis, se han observado arterias coronarias con depósitos de células espumosas cargadas de lípidos. Estas células son presumiblemente macrófagos, que son los progenitores

de las células espumosas xantomatosas y ateroscleróticas. La β -VLDL puede aumentar de 100-200 veces el contenido de colesterol en macrófagos en cultivo y en macrófagos peritoneales de ratón. Se sabe que los macrófagos son los progenitores de la aterosclerosis y las células espumosas xantomatosas. Las partículas de β -VLDL constituyen así las lipoproteínas aterogénicas.

Polimorfismo de apo E

Utilizando técnicas isoelectroenfoque se observó que una de las isoformas de apo E está ausente en sujetos con Hiperlipidemia tipo III, y esta enfermedad se debe a la herencia de 2 alelos para una apo E anormal. Por electroforesis bidimensional, se encuentran 2 tipos de polimorfismo:

- determinado genéticamente
- no determinado genéticamente, sino debido a la sialilación pos-translacional de apoE en restos de Thr 194

Existen 3 isoformas o variantes de apo E (E-4 (forma básica), E-3, E-2 (forma ácida), todas producto del mismo gen. La genética de apo E puede explicarse por la existencia de 3 alelos (ϵ_4 , ϵ_3 , ϵ_2), en un locus génico simple, por lo cual son posible 6 fenotipos: 3 homocigotas y 3 heterocigotas, derivados de la herencia de 2 alelos diferentes.

Homocigotas	Heterocigotas
E-4/4	E-4/3
E-3/3	E-3/2
E-2/2	E-4/2

El fenotipo E-2/2 es el asociado con la Hiperlipidemia tipo III. Las diferentes isoformas se diferencian en 1 aminoácido que puede cambiar, en dos posiciones diferentes en la secuencia de la apo E. Estos aminoácidos que varían, poseen cargas diferentes pues el cambio involucra una Arg en lugar de Cys, lo cual representa las bases moleculares del primer tipo de polimorfismo.

	<u>E2/2</u>	<u>E3/3</u>	<u>E4/4</u>
Carga relativa	0	+1	+2
Residuo 112	Cys	Cys	Arg
Residuo 158	Cys	Arg	Arg

Se estudió la frecuencia de los 6 fenotipos en diferentes poblaciones y se observó que son semejante en todas las poblaciones estudiadas. El más común es el fenotipo E-3/3; el alelo ϵ_3 constituye el mayor del pool de genes apo E. Los diferentes fenotipos de apo E afectan los niveles normales de lípidos, lipoproteínas y apo lipoproteínas: el alelo ϵ_4 , se asocia con disminución de TG plasmáticos, pero aumento de colesterol (\uparrow LDL); mientras que el alelo ϵ_2 , se asocia con

aumento de TG pero disminución de colesterol plasmático (\downarrow LDL). La apo E se asocia con diferentes lipoproteínas: apo E-4, con VLDL, mientras que la apo E-3 se asocia con HDL. El alelo apo E puede explicar aproximadamente el 10% de la variación Inter-individuo en los niveles de colesterol en diferentes poblaciones. Se ha sugerido que el alelo ϵ 4 sería un factor de riesgo para aterosclerosis, ya que está asociado con altos niveles de colesterol.

Ya se mencionó que la apo E se encuentra en varias lipoproteínas plasmáticas, como los Q, los remanentes de Q y VLDL, IDL y una subclase de HDL. El rol más importante de esta apolipoproteína es participar en la interacción con los receptores de LDL y el R-apoE o de remanentes de Q o LRP (proteína relacionada con el receptor de LDL), cuyos ligandos son apo E y apo B. Apo E contiene dos dominios estructurales que definen diferentes funciones: el extremo N-terminal de apo E (1-165) y el C-terminal (200-299), conectados por una región (165-200) de estructura al azar. El dominio Ct contiene una región α -hélice anfipática y representa el dominio de unión a lípidos, mientras que el Nt contiene el sitio de unión al receptor-LDL y a heparina. En el dominio de unión de apo E al receptor de LDL se encuentran restos de Arg y Lys (Fig. 11.1). En la mitad de la molécula de apo E, se hallan 140-160 restos (Arg, Lys, His). La región 136-150 contiene varias Arg y Lys críticas para la unión al receptor, estos aminoácidos se conectan por interacciones iónicas con aminoácidos básicos del R-LDL. La molécula de apo E variante asociada con la hiperlipidemia tipo III, presenta una sustitución de 1 aminoácido simple en una región cercana a la zona de unión al receptor, Apo E-2 (Arg158 \rightarrow Cys). Esta variante de apo E se une muy pobremente al receptor de lipoproteínas, debido al reemplazo de un aminoácido neutro por uno básico. En la apo E3, la Arg en el residuo 158 está involucrada en la formación de dos puentes salinos intra-catenarios (con Asp154 y con Glu96). El reemplazo de este aminoácido por una Cys en la apo E2, hace que se forme un nuevo puente salino (entre Asp154 y Arg150), que cambia la conformación de apo E y así su afinidad para la unión al receptor. Por lo tanto, la mutación en el residuo 158, aunque cae fuera del sitio de unión al receptor, afecta la unión al R indirectamente por alteración de la conformación de la región 136-150.

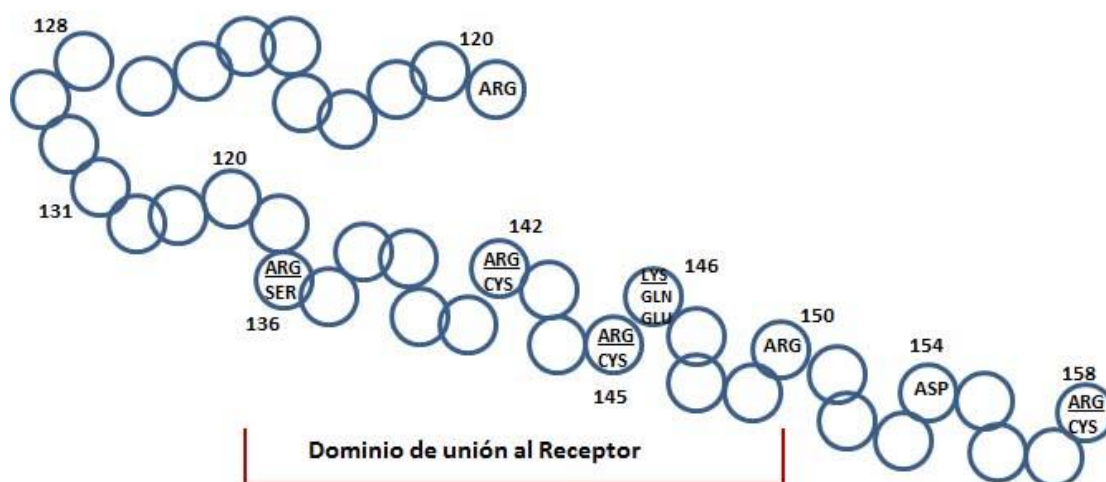


Figura 11.1. Representación de la secuencia de aminoácidos de apo E en la zona de unión al Receptor. Adaptada de Scriver, 2001.

La apo E se sintetiza en varios órganos, el mRNA de apo E, se encuentra en hígado (células parenquimáticas), cerebro (astrocitos), bazo, pulmón, adrenal, ovario, riñón, músculo liso, macrófagos, pero no en epitelio intestinal. Los macrófagos en cultivo pueden producir grandes cantidades de apo E, la que puede ser liberada al medio de cultivo. También lo producen los astrocitos y células del músculo liso.

La apo E se encarga de la redistribución del colesterol desde las células que contienen colesterol en exceso a las células que lo requieren para procesos metabólicos, incluyendo biosíntesis de membranas en la proliferación o reparación celular. Esta función parece ocurrir durante la injuria, por ej. apo E juega un rol clave en la regeneración nerviosa periférica.

Los Q son sintetizados por el intestino para transportar los lípidos de la dieta a los tejidos periféricos y el hígado. Son ricos en apo B-48, apo A-I y -IV. Sufren modificaciones por acción de la LPL, siendo deplecionados en TG, se convierten en remanentes de Q, enriquecidos en colesterol, apo E y Cs y un bajo contenido en TG, siendo finalmente metabolizados por hígado. Las VLDL derivadas del hígado sufren un proceso semejante. Estos remanentes de Q y VLDL son tomados vía el receptor de LDL (LDL-R), que reconoce dos ligandos: apo B100 y apo E y que se expresa en células extrahepáticas y también en el hígado y también por otro receptor, el de apo E o de quilomicrones remanentes. Los quilomicrones adquieren apo E en la circulación, de otras partículas, de tal manera que los quilomicrones remanentes contienen apo B-48, apo E y apo C. Por otro lado, las VLDL que salen del hígado se metabolizan en circulación a IDL, y LDL, que contienen apo B-100 y apo E.

Así, apo E juega un rol importante en el *clearance* de los remanentes de quilomicrones y VLDL, lo cual involucra varios procesos (Fig. 11.2): Secuestro, Procesamiento y Captación.

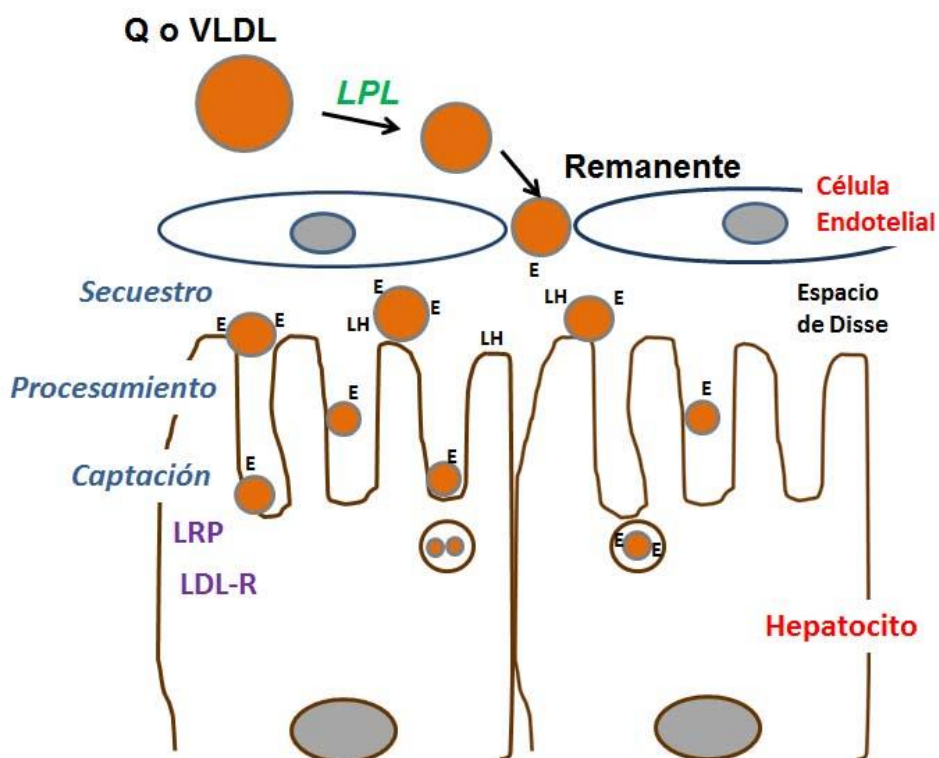


Figura 11.2. Mecanismo de *clearance* de Q y VLDL remanentes desde el plasma al hepatocito. LPL, lipasa proteínica; LH, lipasa hepática; E, apo E; LRP, proteína relacionada con el receptor de LDL; LDL-R, receptor de LDL. Adaptado de Scriver 2001

Secuestro de las partículas en el espacio de Disse. Los remanentes de Q y VLDL pasan a través de las células endoteliales del sinusoides hepático al espacio de Disse y allí se produce la acumulación inicial, que resulta de la unión de las LP a los proteoglicanos (HSPG) presentes en el espacio de Disse, la apo E se une ávidamente a heparán y heparán sulfato de origen hepático. Posteriormente, apo E se acumula dentro del espacio de Disse donde puede adherirse a los proteoglicanos o receptores de LP tales como el LRP.

Luego, los Q remanentes son **procesados** por lipasas sobre las células endoteliales sinusoidales y dentro del espacio de Disse., en este procesos intervienen la LH y la LPL. LPL, que normalmente reside en el endotelio extrahepático puede pegarse a los Q y ser transportada dentro del hígado, donde puede causar un aumento en la unión a los remanentes de LRP.

Internalización. La captación de los remanentes es mediada por receptores como LRP, que es responsable de la internalización de remanentes ricos en apo E, pero la unión inicial requiere la participación de HSPG sobre la superficie celular.

En el modelo de secreción-captura, la apo E es secretada en el espacio de Disse y se asocia con remanentes, los remanentes enriquecidos en apo E son secuestrados allí por interacción con HSPG, los que ayudan en la interacción con los receptores LRP para su unión y posterior internalización.

Patogénesis de la hiperlipidemia tipo III

La presencia de formas variantes de apo E que no se unen normalmente al receptor hepático o HSPG, pueden llevar a la acumulación de remanentes en los pacientes tipo III. Diferentes isoformas de apo E poseen diferentes capacidades para intervenir en la captación hepática de LP. Existe un defecto en el reconocimiento del receptor para apo E-2 (< afinidad); apo E-3 = apo E-4. Se puede demostrar que la apo E-2 de pacientes con hiperlipidemia tipo III es limpiada más lentamente en pacientes que en sujetos normales. Esto podría ser por que el defecto en la unión de apo E podría disminuir el % de VLDL remanentes que son limpiados llevando a un aumento de LDL. Sin embargo, en estos pacientes existe una disminución en la LDL. Esto sugiere un rol de apo E en el procesamiento lipolítico de los remanentes. Se presentó evidencia que apo E juega un rol en el remodelamiento lipolítico de VLDL normal a LDL y que este complejo proceso es dañado en presencia de apo E-2. Además, apo E-3 activa lipasa hepática, mientras que apo E-2 es menos efectiva.

Modo de herencia de la Hipertrigliceridemia tipo III. El modo de herencia (dominante vs recesivo) correlaciona con la mutación específica de la apo E. El desarrollo de la hiperlipidemia tipo III resulta del efecto que tienen las mutaciones sobre uno o más de los componentes del metabolismo de los remanentes. Los parámetros que modulan la expresión de la hiperlipidemia incluyen la actividad de unión al receptor, la unión a heparina (HSPG), la preferencia de LP, y el impacto sobre el procesamiento lipolítico.

Modo de herencia Recesivo. El defecto más común asociado con la hiperlipidemia tipo III es la presencia de una apo E-2 (Arg158→Cys). Para la expresión fenotípica de la enfermedad se requiere una condición de homocigota. Sin embargo, menos del 10% de los homocigotas E-2/2 presentan hiperlipidemia tipo III, la mayoría tienen hipocolesterolemia y disminución en la β -VLDL.

El desarrollo de la hiperlipidemia tipo III (expresión de hipertrigliceridemia y de hipercolesterolemia) requiere la presencia de apo E-2 (anormal) más la ocurrencia de un factor genético, hormonal o del entorno, para precipitar la hiperlipidemia.

Modo de herencia Dominante. La herencia dominante ocurre en varios casos de variantes raras de apo E. En este caso, la presencia de un alelo variantes simple es suficiente para desencadenar la hiperlipoproteinemia tipo III y no se requieren factores secundarios, estas mutaciones inducen defectos en la unión a los receptores de LP. Se sustituyen residuos de aminoácidos básicos (Arg y Lys) en la región 136-150, todos expuestos al solvente y no involucrados en puentes salinos, por lo que afecta directamente la interacción iónica con el receptor.

Las β -VLDL tienen una propensión inusual a ser tomadas por los macrófagos, llevando a una acumulación masiva de colesterol (CE) en estas células. Las células **espumosas** en los xantomas y las lesiones ateroscleróticas derivan, al menos en parte, de los macrófagos. La naturaleza aterogénica de β -VLDL probablemente derive primariamente de su captación por los macrófagos, un proceso que es mediado por receptores que reconoce el ligando es apo E en esta partícula y este receptor es el LDL-R. Las β -VLDL, a pesar de la presencia de apo E-2 defectuosa para la unión al receptor son también tomadas por los macrófagos vía apo E. La apo E casi ciertamente tienen un rol en la movilización del colesterol desde las células periféricas, incluyendo los macrófagos.

Diagnóstico y Tratamiento

Diagnóstico: Aunque no existe una prueba diagnóstica simple, si existen **marcadores diagnósticos**:

- \uparrow C y TG plasmáticos aproximadamente el mismo nivel (>300 mg/dL)
- $[VLDL-Col] / TG > 0.3$ ---> refleja β -VLDL ricas en colesterol, indicativo del tipo III de hiperlipoproteinemia.
- Banda β -ancha en electroforesis en agarosa de plasma entero
- Banda β -ancha + partículas β en la fracción de $\delta < 1.006$ g/ml por ultracentrifugación es un predictor de tipo III (aunque la disbetalipoproteinemia, la presencia de β -VLDL, existe independientemente de la hiperlipidemia).
- Lo más diagnóstico de las características clínicas: **xantomas palmares** en palmas de las manos (aunque no aparecen en todos los Tipo III); los xantomas tuberosos son frecuentes pero existen en otras enfermedades.
- Coexistencia de **enfermedad vascular prematura** e hiperlipidemia, es sospecha de Tipo III (particularmente si existe enfermedad vascular periférica)

- El mejor marcador diagnóstico bioquímico es el **fenotipo apo E-2/2**. Esto junto con cualquier otro marcador es virtualmente diagnóstico de Tipo III.

Se determina por isoelectroenfoque de fracción $\delta < 1.006$ o $\delta < 1.02$ g/ml de un pequeño volumen de plasma fresco, unidimensional o bidimensional.

Ahora se dispone de un ensayo para genotipeado más específico que es más conveniente y certero. Se basa en el uso de sondas de DNA que distinguen entre la presencia de Arg y Cys en los residuos 112 o 158 para identificar las isoformas más comunes: apo E-3, E-2 y E-4.

Debido a la naturaleza familiar de este desorden y a su acelerada enfermedad cardiovascular, los parientes del paciente deben ser investigados por hiperlipemia y fenotipeados.

Consejo familiar: para eliminar los factores que aceleran la enfermedad (obesidad, exceso de alcohol, hipotiroidismo, intolerancia a la glucosa).

En ausencia de factores conocidos que influyen la expresión de hiperlipidemia tipo III, el fenotipo E-2/2 por sí solo no significa un riesgo de enfermedad vascular periférica.

Tratamiento. Esta hiperlipoproteinemia tipo III responde muy bien a la terapia: normalmente con dieta sola o en combinación con tratamiento por condiciones metabólicas preexistentes: hipotiroidismo, marcada ganancia de peso, DM descompensada, excesivo consumo de alcohol. El tratamiento lleva a una disminución en los niveles de TG y C, pero existirá una pequeña cantidad de β -VLDL plasmática, secundaria a la presencia de la apo E-2 anormal.

Dieta:

↓ Consumo calórico en individuos con sobrepeso.

↓ Colesterol y grasas saturadas en la dieta.

Drogas: que normalicen los niveles de colesterol y TG.

Acido nicotínico (niacina), disminuye la síntesis de VLDL-TG y aumenta la velocidad de catabolismo de VLD.

Clorofibrato (clofibrate, beclobrate, bezafibrate, ciprofibrate, fenofibrate, y gemfibrozil): ↓ TG y colesterol, inhiben síntesis de col en hígado y ↑ actividad lipolítica.

Estatinas (lovastatin, simvastatin): actúan como un inhibidor competitivo de HMG-CoA reductasas: ↓ Colesterol, Inhibe la síntesis de Col hepático y ↑ R-LDL en el hígado.

La disminución de los niveles de lípidos con la dieta o drogas correlaciona con una disminución en el tamaño de los xantomas o completa desaparición de estos depósitos de lípidos.

Referencias

Ramasamy Y. Update on the molecular biology of dyslipidemias. Clinica Chimica Acta 454 (2016) 143–185.

Scriver CR et al. (Eds). The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw Hill, 2001.

CAPÍTULO 12

Hipercolesterolemia Familiar

Ana María Cortizo

Introducción

La hipercolesterolemia familiar (HCF) es una enfermedad genéticamente determinada, monogénica, caracterizada clínicamente por:

- Concentraciones elevadas de LDL plasmática
- Depósitos aumentados de colesterol (C), derivado de LDL, en tendones y piel (xantomas) y en arteriolas (ateromas)
- Un patrón de herencia autosómico dominante (AD) con efecto de dosis génica, siendo el cuadro clínico de los homocigotas más grave que el de los heterocigotas

El gen afectado se encuentra en el brazo corto del cromosoma 19, y codifica para el receptor de LDL (LDLR), aunque se han detectado formas variantes que afectan otros genes asociados con el metabolismo de LDL. Los individuos heterocigotas representan 1:500, lo que significa que la HCF es una de las enfermedades congénitas del metabolismo más frecuente. Los homocigotas, son mucho menos numerosos y aparecen con una prevalencia de 1: 10⁶.

Características clínicas

En los individuos **heterocigotas**, la manifestación más temprana es la **Hipercolesterolemia** puede detectarse desde el nacimiento (y durante la primer década como el único descubrimiento), que se manifiesta a lo largo de toda la vida. El **arco corneal** (depósitos de C esterificado, CE, en el arco corneal) y los **xantomas** en tendones aparecen al final de la segunda década. Los síntomas clínicos de **enfermedad cardíaca coronaria**, que son la causa de muerte, aparecen recién en la 3er década en adelante.

Las otras **lipoproteínas** (LP), como VLDL pueden encontrarse en niveles normales o levemente aumentados, mientras que HDL es normal o levemente baja.

Los **xantomas** se presentan tanto en homo como en heterocigotas y aumentan con el avance de la edad del paciente. Los xantomas palpebrales o xantelasmas no son patognomónicos de la

HCF. Los xantomas tendinosos parecen especialmente en el tendón de Aquiles y en los tendones extensores de las manos; en cambio, los xantomas tendinosos son patognomónicos de HCF.

La **aterosclerosis prematura** es una característica de esta enfermedad, que en los paciente **homocigotas** se presenta tempranamente y es progresiva. Compromete la aorta y arterias coronarias, llevando a *angina pectoris*, infarto de miocardio y muerte súbita antes de los 30 años. La frecuencia de muertes debidas a enfermedad cardiaca coronaria entre los individuos homocigotas, varía inversamente con el número de LDLR funcionales medidos en fibroblastos en cultivo (Fig. 12.1).

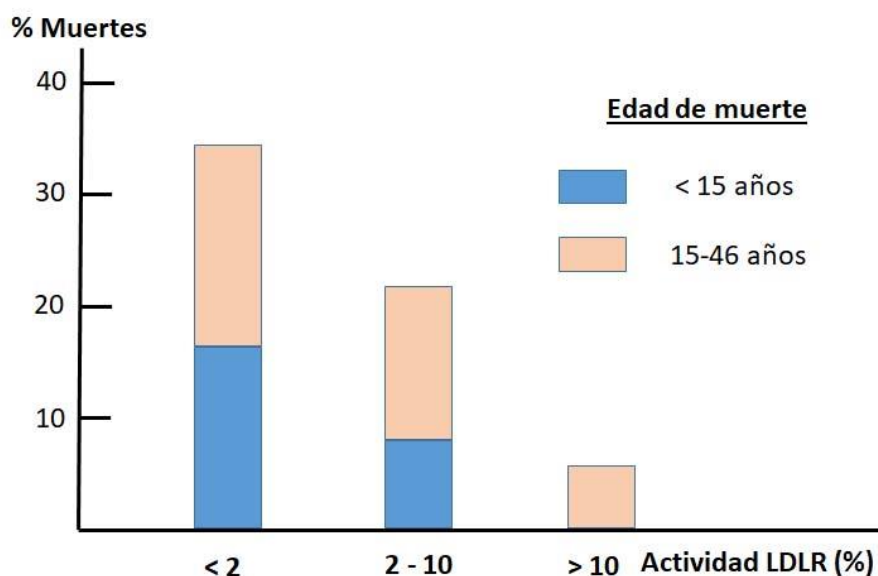


Figura 12.1. Frecuencia de muertes a diferentes edades en un grupo de pacientes con HCF homocigotas, con diferentes actividades para el receptor de LDL (LDLR). Adaptado de Scriver 2002

La duración y severidad de la hipercolesterolemia correlaciona con el desarrollo de aterosclerosis. El patrón de enfermedad cardiaca en los heterocigotas es mucho más variable que en los homocigotas. Se puede evaluar el riesgo en los individuos heterocigotas de sufrir enfermedad cardiaca y fallecer por infarto en función de la edad, y se encuentra que esto depende de la edad del paciente y del sexo, siendo menor en mujeres que en varones, sugiriendo una protección por los estrógenos.

Aspectos genéticos

Modo de Herencia. La HCF se transmite como un rasgo AD.

Se reportó la distribución de los niveles de C plasmático en un estudio realizado en una gran familia aleutiana con HCF, en comparación con individuos controles apareados por edad y sexo. Se demostró en esta familia, en que todos los individuos afectados eran heterocigotas, que la enfermedad estaba determinada por un mecanismo monogénico. Se observó una distribución

bimodal en los niveles de C en esta familia de 92 miembros, en los que el gen mutante se segrega como un rasgo AD. Específicamente la elevación del C estaba asociada a la LDL plasmática, sin efectos sobre los niveles de TG y llevo a la aparición temprana de xantomas y enfermedad cardiaca coronaria.

También se estudió en una familia libanesa, en la que se pudo determinar que los individuos más jóvenes afectados son homocigotas. La frecuencia de consanguinidad entre los padres de los homocigotas aparentes (58%) fue mucho más alta que la frecuencia de consanguinidad que en la población libanesa general (10%).

Prevalencia Población. Se ha estimado que en la población caucásica general, la frecuencia de la HCF heterocigota es de 1 : 500. Sin embargo, se ha notado una prevalencia relativamente más alta en tres poblaciones en el mundo:

- Libaneses: homocigotas 1 : 10.000; heterocigotas 1 : 171
- Quebec (franceses canadienses): heterocigotas 1 : 270
- Sud África (dos poblaciones): heterocigotas africanos 1 : 100
Judíos Ashkenazi 1 : 67

Esta enfermedad se expresa en todas las poblaciones del mundo y es una de las dos más frecuentes asociadas con una mutación monogénica (la otra es la hemocromatosis).

La HCF está sub-diagnosticada y se cree que menos del 1% de los pacientes se han diagnosticado en todo el mundo. En Latinoamérica se conocen los datos de México, Brasil y Chile, donde se han reportados menos de 1% de los casos estimados, reflejando claramente el sub-diagnóstico de la enfermedad en la mayoría de los países. La Argentina finalizó el año 2017 con una población de 44.271.041 habitantes, de donde puede estimarse que si la prevalencia de HCF heterocigota fuera de 1:500, deberíamos tener alrededor de 88.500 individuos con esa patología; sin embargo hasta hoy menos del 1% de estos casos han sido identificados.

Las mutaciones que se asocian con HCF se deben a defectos en los siguientes genes:

- receptor LDL (**LDLR**), (94% de los casos de HCF)
- **apo B** (se une al LDLR)
- la proproteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9 (**PCSK9**), enzima encargada de la degradación del receptor LDL.
- **LDLRAP1**, interviene en la internalización de LDLR en los hoyos tapizados de clatrina

Alteraciones patológicas

Los niños homocigotas presentan severa aterosclerosis de aorta y arterias, isquemia y daño miocárdico, esclerosis y deposición de lípidos en aorta y válvula mitral. Las células cargadas de lípidos derivan de diferentes fuentes, incluyendo células de músculo liso, células endoteliales,

histiocitos de la íntima y monocitos circulantes. Los xantomas cutáneos en los pacientes HCF homocigotas están compuestos de un gran número de células espumosas histiocíticas sobre un estroma fibrovascular.

Patogénesis

Aclaramiento de ldl y funciones regulatorias

Los defectos genéticos asociados con HCF se descubrieron usando fibroblastos en cultivo. Las células de mamíferos en cultivo necesitan colesterol para sobrevivir, el cual obtienen del medio o de la síntesis *de novo*. El colesterol se usa para la síntesis de membranas celulares, donde modula la fluidez de la bicapa de fosfolípidos y el exceso de colesterol se almacena en forma de gotas lipídicas en el citoplasma como éster de colesterol. En presencia de colesterol en el medio (como LDL), las células sintetizan muy poco colesterol. Para su captación, la LDL se une a un receptor de superficie (LDLR), a través de la interacción con la apo B-100. Sin embargo el LDLR también reconoce con alta afinidad la apo E, unida en múltiples copias a VLDL, IDL y Q remanentes (aproximadamente 20 veces más que para LDL que contiene una sola copia de apo B-100). El número de LDLR es variable, dependiendo de las necesidades de cada célula y los niveles de LDL.

La LDL, sigue una serie de pasos secuenciales (unión, internalización, hidrólisis lisosomal y acciones regulatorias en el interior celular (Fig. 12.2)

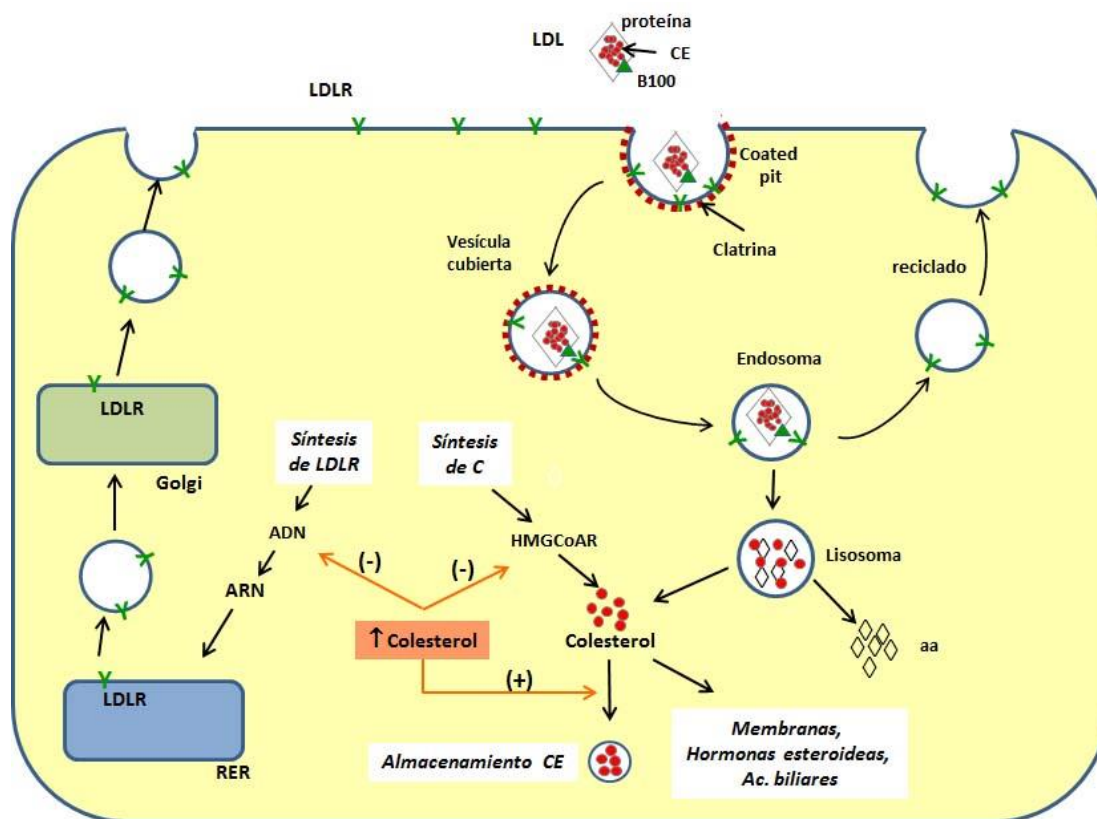


Figura 12.2. Pasos secuenciales en el metabolismo de LDL y LDLR. Adaptado de Scriver, 2002

El LDLR es una glicoproteína, luego de ser sintetizado en el RER como un precursor, contienen una cadena de carbohidratos N-ligadas, rica en manosa y cadenas O-ligadas (N-acetilgalactosamina). Desde el RER pasa al complejo de Golgi, a la superficie celular donde se ubica en hoyos tapizados de clatrina (coated pit), forman endosomas y vuelve a la superficie celular, donde puede unir LDL. El complejo LDL-LDLR, internalizado en endosomas, puede liberar el LDL-colesterol debido al pH ácido (6.5), y al fundirse con un lisosoma, se libera el CE que es hidrolizado por lipasas lisosomales y así el C pasa al citosol. Allí puede ser usado para la síntesis de membranas o ejercer su efecto regulatorio sobre la homeostasis de C intracelular. Esta secuencia de eventos y destino del LDL-C puede ser estudiada por microscopía electrónica, usando LDL marcada con ferritina y también por métodos de fractura por congelación.

Efectos regulatorios de LDL. El colesterol libre, además de usarse para las necesidades de cada tejido, ejerce efectos regulatorios importantes:

- ↓ HMGCoAR (hidroximetil glutaril Co A reductasa, enzima que controla la síntesis de colesterol)
- ↑ ACAT (acil colesterol acil transferasa, regula la esterificación y almacenamiento de colesterol ester)
- ↓ LDLR

Bajo condiciones basales, es decir en un medio que contienen suero con LDL, se establece un estado estacionario en el cual los niveles de HMGCoAR (y la síntesis de C) es baja, y las células disponen de las pequeñas cantidades de C que necesitan, usando un pequeño número de LDLR. Bajo estas condiciones, los niveles de ACAT se mantienen en un nivel intermedio de tal manera que la velocidad de síntesis de CE igual a la velocidad de hidrólisis. Cuando los niveles de colesterol extracelular caen (↓LDL), aumenta la síntesis *de novo* de C y aumenta la expresión de LDLR. Por el contrario, si se agrega C al medio de cultivo de fibroblastos o ↑LDL circulante, puede verse que disminuye la síntesis *de novo* de C, aumenta el nivel de esteriferasas y el C se esterifica y es almacenado. Así, el efecto global del sistema regulatorio es coordinar las Fuentes intra- y extracelulares de C, a fin de mantener constante el nivel de C dentro de la célula, en el caso que ocurran fluctuaciones en la disponibilidad de lipoproteínas.

Estructura del LDLR. El gen del LDLR está codificado en el brazo corto del cromosoma 19, está dividido en 18 exones y 17 intrones. El exón 1 codifica para una secuencia señal de 21 aa que es clivada en el RER, produciendo la proteína madura de 839 aminoácidos (Fig. 12.3). Los exones 2-6 codifican para un dominio de unión al ligando y comprende 7 secuencias de aproximadamente 40 aa en tándem. Cada repetido contiene 6 Cys que forman puentes –S-S- intra-repetido y en el extremo Ct de cada uno hay un *cluster* de aminoácidos cargados negativamente. Los dos ligandos para LDLR (apo B-100 y apo E) poseen secuencias diferentes pero ambos tienen segmentos cortos ricos en aminoácidos básicos que contienen el sitio de unión al LDLR. Por cristalografía de Rx se ha visto que hay un átomo de Ca^{2+} que interacciona directamente con el Ct

del repetido número 5, incluyendo dos residuos acídicos en una secuencia altamente conservada. Este Ca juega un rol clave en el arrollamiento de este dominio del LDLR y su capacidad de unión a los ligandos.

Los exones 7-14 de gen de LDLR codifican para una secuencia de aa con homología a una porción del precursor de EGF (factor de crecimiento epidérmico). Esta región incluye tres repetidos del factor de crecimiento (A, B, C), secuencias de 40 aminoácidos ricas en Cys. Este dominio es necesario para la disociación, dependiente del pH, de la LDL y LDLR en los endosomas, durante el proceso de reciclado del receptor y también sirve para ubicar correctamente el dominio de unión al ligando a fin de que pueda unir LDL sobre la superficie celular. El exón 15 codifica para una secuencia rica en Ser y Thr, varias de las cuales sirven como sitios de unión a carbohidratos O-ligados.

El exón 16 y el extremo 5' del exón 17 codifican para un dominio que expande la membrana y sirve para anclar al LDLR a la misma, mientras que el resto del exón 17 y el extremo 5' del exón 18 constituyen un dominio citoplasmático. En este último hay dos señales discretas, una para localizar el LDLR a los hoyos tapizados de clatrina (*coated pits*) y el otro para dirigir al LDLR a la superficie sinusoidal del hepatocito polarizado. El resto del exón 18 codifica para una región 3' no traducida del mRNA.

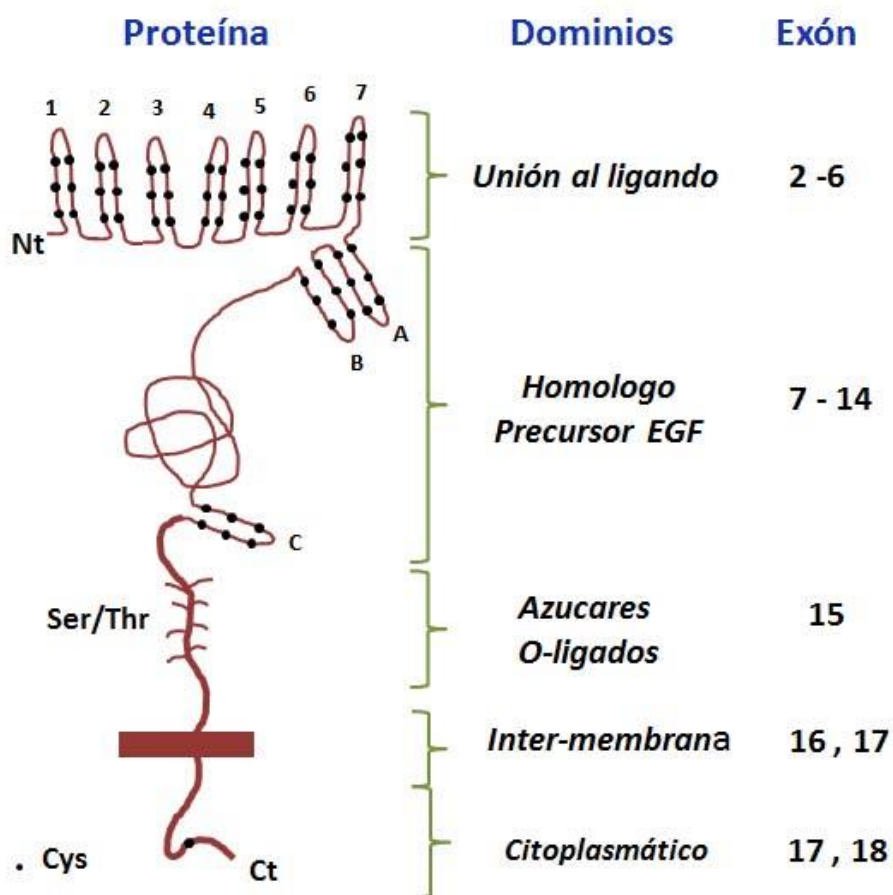


Figura 12.3. Dominios estructurales del receptor de LDL (LDLR). Adaptado de Scriver, 2002.

Estructura del Promotor del gen LDLR. La transcripción del gen de LDLR, en particular en el hígado, es regulada a través de mecanismos de retroalimentación, con el fin de estabilizar la composición de lípidos de las membranas celulares. Este sistema regulatorio, fisiológicamente importante, es responsable de la inhibición que ejerce una dieta rica en grasas sobre los niveles de LDLR, y el aumento de los mismos como consecuencia del uso de agentes depresores del C (inhibidores de HMGCoAR y el uso de resinas que unen ácidos biliares).

El gene LDLR contiene en la región 5' (el promotor) una secuencia de ADN de acción *cis*, responsable de la expresión del gene, que es regulada por esteroides (Fig. 12.4). Dentro de los 200 pb del codón de Met de iniciación, hay 3 repetidos de 16 pb cada uno, dos secuencias ricas en A/T (TATA boxes) y un cluster de sitios de iniciación, todos los cuales funcionan en la transcripción. Las secuencias de 16 pb de los repetidos 1 y 3 interaccionan con el factor de transcripción Sp1 para promover la transcripción; pero requieren la contribución del repetido 2 que contienen un elemento regulatorio positivo para esteroides (SRE-1) de 10 pb. El sitio SER-1 es una familia de factores de transcripción, las proteínas de unión a elementos regulatorios de esteroides (SREBPs, *sterol regulatory element binding proteins*). En ausencia de esteroides, la forma activa del SREBP actúa en forma sinérgica con los dos Sp-1 y promueven la transacción del gene de LDLR. En cambio, en presencia de esteroides, no se genera forma activa de SREBP y se detiene la transcripción del gene LDLR, aun si los SP-1 se encuentren unidos al ADN en las dos secuencias repetidas 1 y 3 del promotor. Así, cuando las células son cultivadas en presencia de esteroides, hay una reducción en el ARNm y de la proteína del LDLR.

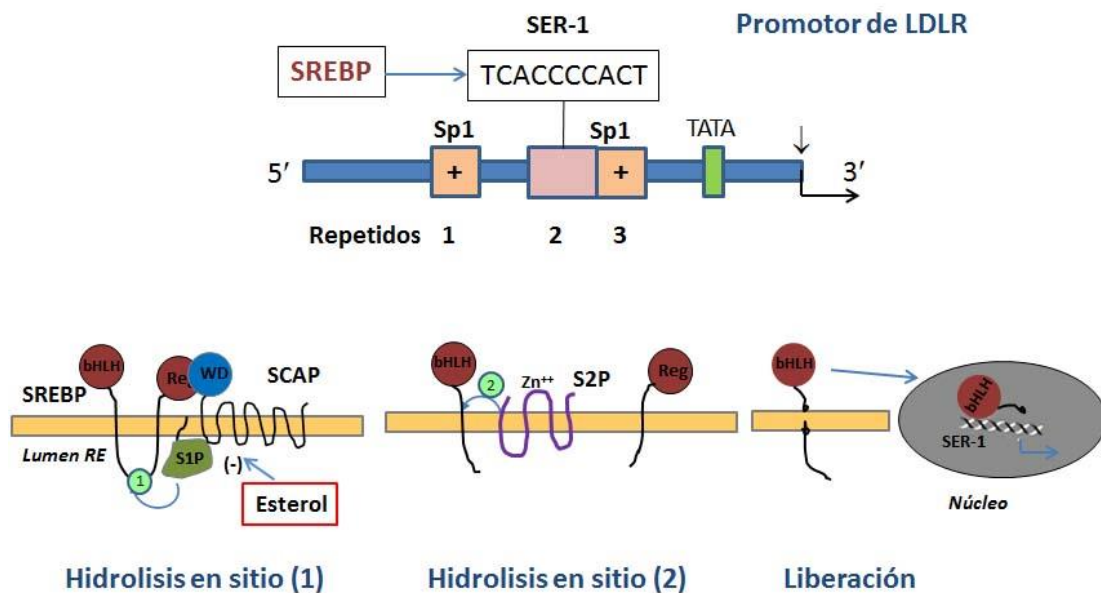


Figura 12.4. Región 5' del promotor de LDLR (arriba). Vía de hidrólisis de SREBP (abajo) mostrando los dos sitios (1) y (2) para la acción de las dos proteasas, S1P y S2P, así como la proteína sensora del esteroil (SCAP). Adaptado de Scriver 2002

SREBP es una molécula unida a membrana, cuya actividad es controlada por acción proteolítica mediada por esteroides. Contiene una zona Nt de aminoácidos ácidos (bHLH) que funcionan como activadores de la transcripción, formando homo u heterodímeros que pueden unir secuencias específicas de ADN. Esta región es seguida por un dominio de unión a la membrana, del RER y la envoltura nuclear (dos secuencias que expanden la membrana conectadas por un *loop* hidrofílico, formando una horquilla) y a continuación se encuentra el dominio regulatorio Ct, que se proyecta al citoplasma.

Regulación del nivel de expresión del gen del R apoB100/E. Los esteroides regulan la proteólisis ácida de las SREBPs, a través de dos sitios de clivaje (Fig 12.4). Para activar la transcripción, el dominio Nt de SREBP debe ser liberado de la membrana para entrar al núcleo, lo que ocurre por acción en dos pasos de hidrólisis de dos proteasas. En una primera etapa, la proteasa del sitio 1 (S1P), proteasa de Ser unida a membrana, corta a nivel del *loop* luminal (zona de la horquilla). Esto requiere de la acción de una proteína reguladora llamada SCAP (SREBP-*cleavage activating protein*), la cual posee un dominio Ct (WD) que se une al dominio regulatorio Ct de SREBP formando un complejo estable que permite su estabilización y clivaje. La actividad de S1P es regulada por esteroides: en células deplecionadas de esteroides, el S1P es activa, mientras que si hay elevado niveles de esteroides, la actividad de S1P es suprimida. SCAP contiene un dominio que detecta los niveles de esteroides y así regula la actividad de S1P. Como consecuencia de la hidrólisis de SREBP, se obtienen dos mitades de la proteína, que permanecen unidas a la membrana. A continuación ocurre la hidrólisis del 1er dominio transmembrana de la mitad Nt, por acción de una proteasa de sitio 2 (S2P), una metaloproteasa de Zn. Se libera así de la membrana el extremo Nt de SREBP que entra al núcleo donde desencadena un programa que lleva al aumento en la captación y síntesis de C y AcGr, debido al aumento en la transcripción del gen LDLR y el aumento en la transcripción de genes que codifican para varias enzimas del metabolismo del C (HMGCoA sintasa, HMGCoAR, farnesil difosfato sintasa, escualeno sintasa y lanosterol demetilasa). Los inhibidores de HMGCoAR, aumentan la cantidad de SREBP y así la expresión de LDLR.

Clases fenotípicas de mutaciones del R apoB100/E: las mutaciones del LDLR se pueden dividir en 5 clases o fenotipos en bases a los efectos sobre la proteína receptora.

1. Receptor nulo (afecta la síntesis de LDLR). 17% de las mutaciones, no se expresa el ARNm para el LDLR
2. Mutaciones que afectan el transporte de LDLR a la membrana plasmática. 85% de las mutaciones y las más frecuentes
3. Alteraciones en la unión al ligando (o *binding*). 7% de las mutaciones.
4. Mutaciones que afectan el *clustering* (agrupamiento) 4% de las mutaciones.
5. Mutaciones que afectan el reciclado del LDLR. 22%

Los mecanismos asociados con estas mutaciones son mutaciones puntuales y deleciones o inserciones pequeñas (<25 pb) en homocigotas para HCF. El 12% se asocian con deleciones o inserciones grandes.

En los individuos con la forma **homocigota** de HCF, la concentración de LDL plasmática y la severidad de la aterosclerosis coronaria presentan variabilidad fenotípica, aun entre individuos homocigotas para la misma mutación. Esto sugiere que existirían otros genes que influyen en el fenotipo y que serán importantes en la expresión clínica de la HCF. En general, la severidad de las manifestaciones clínicas en estos pacientes correlaciona con el nivel de actividad del LDLR, evaluado a través de los estudios con fibroblastos en cultivo. Por otro lado, en los pacientes **heterocigotas** para HCF, la naturaleza del defecto molecular en el LDLR parece tener menos efectos que en los individuos homocigotas sobre el nivel del LDL plasmático. Las manifestaciones clínicas en los heterocigotas también son modificadas o moduladas por factores del entorno, especialmente la dieta.

Pruebas de laboratorio para la determinación de la actividad del LDLR: estos ensayo se llevaron a cabo con fibroblastos en cultivo de pacientes homocigotas para HCF o de individuos controles. Se cultivan las células tratando de maximizar la expresión de LDLR, es decir, en ausencia de suero y utilizando como ligando I¹²⁵-apoB100-LDL, o LDL “fría”, H³-Col-LDL, o ¹⁴C-acetato (para evaluar la síntesis de colesterol), bajo diferentes condiciones (Fig. 12.5). Para analizar el *binding* o unión al LDLR, se usa ¹²⁵I-LDL en trazas y se incuba a baja temperatura (4 °C), para evitar la internalización. Este último proceso puede estudiarse incubando las células a 37 °C y analizando la marca en el interior celular. La hidrólisis de apo B100 puede ser evaluada analizando la formación de productos de degradación como ¹²⁵I-Tyr; mientras que la hidrólisis de CE, a través de la formación de ³H-colesterol a partir de ³H-colesterol linoleato. La actividad de ACAT puede medirse usando ¹⁴C-AcGr y seguir la incorporación a CE.

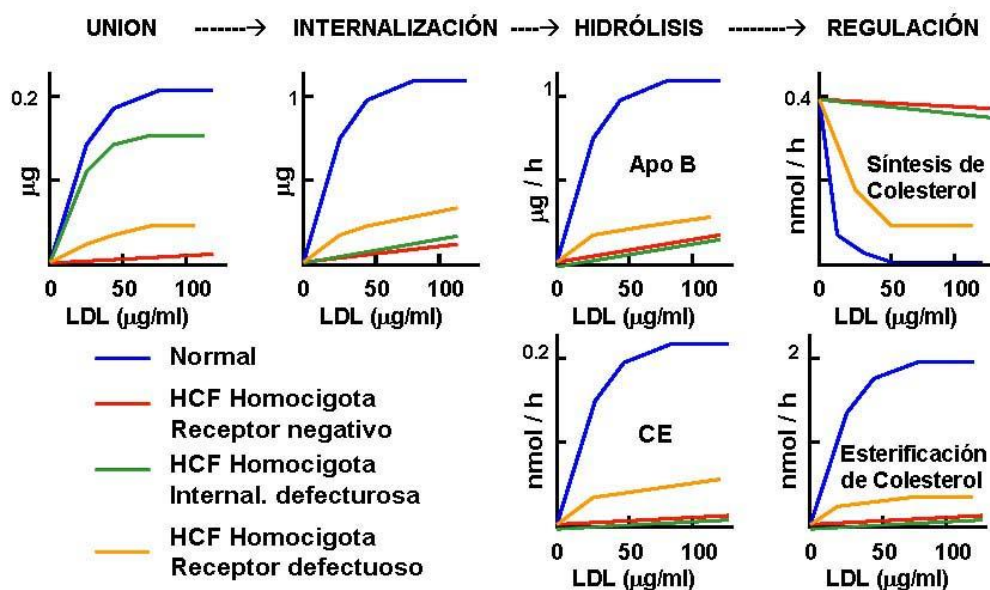


Figura 12.5. Procesos mediados por LDLR-LDL en fibroblastos de individuos normales (sanos) y de pacientes homocigotas para HCF con diferentes alteraciones en el metabolismo del colesterol. Adaptado de Scriver 2002.

Los fibroblastos con mutaciones nulas (clase 1) muestran menos del 2% de la cantidad normal de unión de alta afinidad, captación y degradación de ^{125}I -LDL. Además, en las células con la mutación (LDLR negativo), LDL no inhibe la actividad de HMGCoAR o la síntesis de C, ni tampoco activa la formación de CE.

Los fibroblastos con defecto de tipo 2, hay un marcado retraso en el transporte de los receptores desde el RE y desde el Golgi y el peso molecular aparentes es menor (ya que no se glicosilan, azúcares N- u O-ligados) al del LDLR normal. Eventualmente, el receptor es degradado sin alcanzar la superficie celular, de tal manera que el fenotipo de estos fibroblastos es similar al de clases 1.

Las mutaciones de tipo 3 se asocian con defectos en la unión del ligando al receptor LDLR, mientras que los de clase 4 muestran el receptor en la superficie celular pero no en los hoyos tapizados clatrina (*coated pits*) y por lo tanto no pueden transportar el ligando dentro de la célula (defectos en la internalización o internalización defectuosa).

Finalmente, sabemos que el dominio de homología al precursor de EGF es importante para la disociación del LDL y LDLR a pH ácido en el endosoma, un evento esencial para el reciclaje de los receptores. Mutaciones en este dominio llevan a un LDLR que no puede liberar el ligando LDL al citosol y por lo tanto el colesterol no puede utilizarse ni ejercer sus funciones regulatorias, y el complejo LDLR-LDL es degradado.

Mecanismos patogénicos

La vía de receptores LDLR, que inicialmente se observó en fibroblastos, se demostró también en todas las células animales crecidas en cultivo. En todas ellas, el LDL-colesterol se usa para la síntesis de membranas y para la regulación de la homeostasis del colesterol. En las células adrenales, LDL sirve como precursor de la síntesis de hormonas esteroideas.

En estudios *in vivo*, se demostró la actividad de LDLR en los linfocitos circulantes. Haciendo estudios de captación y degradación de ^{125}I -LDL por linfocitos de individuos controles y con HCF cultivados *in vitro*, se vio que los derivados de homocigotas no expresaban cantidades detectables del receptor, mientras que los derivados de pacientes heterocigotas expresaban niveles intermedios (30% del control), respecto a los de individuos controles sanos (100%). Estudiando la velocidad de desaparición de la ^{125}I -LDL inyectada intravenosamente, del plasma de pacientes heterocigotas y homocigotas, se observó que era removida más lentamente en los pacientes con HCF heterocigota (vida media, 4.5 días) que en el plasma de los individuos sanos (vida media, 2.5 días), y mucho más lentamente en los pacientes homocigotas (vida media, 6.0 días). La disminución en el catabolismo de LDL *in vivo*, correlaciona con la deficiencia relativa del LDLR evaluada a través de los estudios con linfocitos en cultivo.

Es también posible evaluar el *clearance* de LDL circulante, mediado por LDLR o por una vía independiente del receptor, usando LDL modificada en sus restos de Arg o Lys, por ej. glicosilada. Esta LDL modificada es removida 5 veces menos que la LDL nativa, indicando que 4/5 es removida por la vía del LDLR (Fig. 12.6A).

La contribución relativa del LDLR al *clearance* de LDL también puede evaluarse comparando la velocidad de catabolismo de ^{125}I -LDL inyectada intravenosamente en individuos normales y en pacientes con HCF homocigota. La velocidad de catabolismo fraccional, es decir la fracción del pool de LDL plasmática total removida por unidad de tiempo, es alrededor de 3 veces más alta en sujetos normales que en los homocigotas de HCF (Fig. 12.6 B). Estas observaciones sugieren que alrededor de 2/3 del *clearance* de LDL ocurre a través del LDLR.

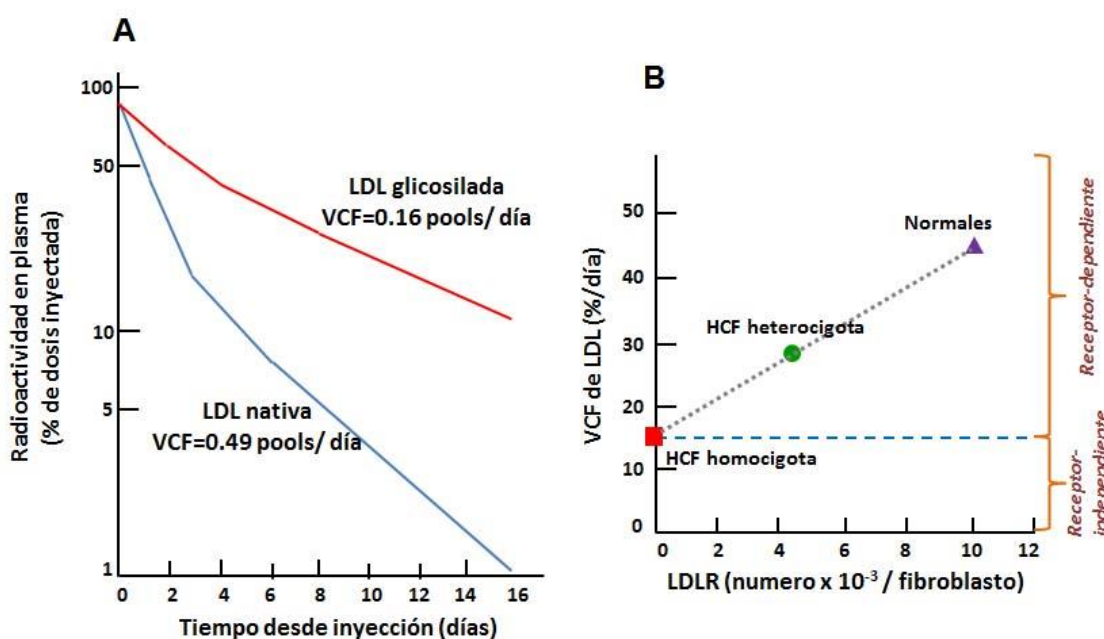


Figura 12.6. (A) Curva de decaimiento de LDL después de la inyección de ^{125}I -LDL nativa (celeste) o ^{125}I -LDL glicosilada (rojo) en un individuo normal. VCF, velocidad catabólica fraccional. (B) Relación entre la VCF de LDL y el número de receptores para LDL (LDLR) sobre fibroblastos de un individuo normal (triángulo violeta) y pacientes con HCF homocigota (cuadrado rojo) y heterocigota (círculo verde). Adaptado de Scriver 2002.

En ausencia de LDLR, como en los pacientes homocigotas para HCF, la LDL es degradada por otra vía, entre ellas la de los macrófagos e histiocitos del sistema retículo endotelial, que usan receptores *scavengers*. En estos pacientes se encuentra gran cantidad de células espumosas en la pared arterial, macrófagos del bazo, células de Kupffer, histiocitos de médula ósea. Además, el aumento en la permanencia de LDL circulante lleva a la oxidación de LDL, que puede ser reconocida por los macrófagos y acelerar el proceso aterogénico asociado con HCF.

Relación entre el LDLR y la Hipercolesterolemia dietaria: dentro de todos los individuos con hipercolesterolemia, los pacientes heterocigotas HCF constituyen una pequeña fracción. La hipercolesterolemia se puede desarrollar aun si los dos alelos para el LDLR son normales. Se ha sugerido que la hipercolesterolemia Poligénica se debe a la supresión del proceso de

regulación negativo de la expresión del gen de LDLR, que ocurre a través de los elementos de respuesta a esteroides (Fig 12.4). La ingesta de una dieta rica en grasas saturadas y colesterol aumenta la concentración de LDL, lo cual ocurre por una regulación negativa de LDLR a nivel hepático. La supresión de LDLR es variable en la población, y esto depende de diversos factores como hormonales, nutricionales y farmacológicos, que pueden influenciar la expresión hepática del LDLR (Tabla 12.1).

Tabla 12.1. Factores que regulan la expresión de LDLR hepático.

Regulación	Factores	
↑ LDLR	Hormonales	- Tiroxina - Hormona de Crecimiento
	Nutricionales	- Deprivación de Colesterol - Ayuno (en ratas y perros)
	Farmacológicos	- 17 α -Etil estradiol - Resinas de unión a ácidos biliares (colestiramina y colestipol) - Inhibidores de HMGCoAR (lovastatin, simvastatin, pravastatin, atorvastatin, fluvastatin, cerivastatin)
↓ LDLR	Genéticos	- HCF - Edad
	Nutricionales	- Alimentación con Colesterol (incrementada por AcGr saturados, pero no por poliinsaturados) - Dieta sin grasa de Caseína y Almidón de trigo - Ayuno (en conejos, pero no en ratas o perros)

Diagnostico

Diagnóstico Clínico: El diagnóstico clínico de los **homocigotas** en general no es difícil, además de los xantomas cutáneos y aterosclerosis juvenil, la presencia de LDL-C plasmático > 650 mg/dL en un niño sin ictericia es virtualmente patognomónico. Algunos pacientes con niveles tan elevados de LDL-C por otras causas podrían confundirse con un HCF homocigota, pero estos últimos no responden a la reducción dietaria de Colesterol y/o el uso de resinas.

Por otro lado, el diagnóstico de pacientes con HCF **heterocigotas** comienza con el descubrimiento de altos niveles de LDL circulantes, con TG normales. Si el nivel de C total está cerca o en el límite superior normal, debe determinarse el HDL-C, para confirmar que el elevado C plasmático está en la fracción de LDL. Una vez determinado esto, hay que confirmar que dicha elevación se debe a la HCF heterocigota. Menos de 1 : 20 individuos con elevado C plasmático o LDL-C tienen HCF; la mayoría de los individuos con un patrón de LP tipo 2 tienen hipercolesterolemia Poligénica, derivada de una combinación de factores del entorno y múltiples factores

genéticos no completamente conocidos. El diagnóstico de HCF heterocigota puede hacerse en presencia de una historia familiar de hipercolesterolemia, xantomas tendinosos y/o enfermedad cardíaca coronaria prematura, aunque necesariamente debe descartarse otras dos enfermedades monogénicas, la hiperlipidemia combinada familiar y la FDB (Defecto familiar en apo B100).

Diagnóstico de Laboratorio: para cuantificar el LDLR, se pueden hacer cuatro ensayos funcionales utilizando fibroblastos de piel en cultivo o en linfocitos circulantes, como se describió en la Fig 12.5: a) medida de la unión y captación intracelular de ^{125}I -LDL; b) medida de la velocidad de degradación de ^{125}I -LDL; c) medida de la inhibición mediada por LDL de la síntesis de ^{14}C -Colesterol a partir de ^{14}C -acetato en células intactas o de la actividad de HMGCoAR en un extracto libre de células y d) medida de la estimulación mediada por LDL de la incorporación de ^{14}C -oleato en ^{14}C -oleato-CE.

En poblaciones con alta frecuencia de ciertas mutaciones para el LDLR (afrikáners, franceses canadienses, finlandeses, islandeses, cristianos libaneses), la mutaciones se pueden detectar directamente a partir de extractos de ADN de GB por técnicas de PCR. Sin embargo, en la mayoría de las poblaciones, la gran variabilidad de diferentes mutaciones para LDLR excluye un diagnóstico directo de ADN, a menos que se sospeche de una mutación particular. Hay kits disponibles comercialmente para buscar las mutaciones más comunes, y también se puede usar un ensayo de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) para el *screening* de otras mutaciones, pero hay que considerar que se han descrito más de 2900 variantes para el gen de LDLR (90-97% de las mutaciones que causan HCF).

En realidad, desde el punto de vista del tratamiento, solo se necesita conocer el nivel de LDL-C, la única ventaja de conocer la mutación en particular en un paciente con hipercolesterolemia, radica en poder informar sobre el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria y llevar adelante estrategias preventivas para disminuir el colesterol en los familiares.

El **diagnóstico prenatal** de HCF puede realizarse usando ADN genómico (de vellosidades coriales a las 8 semanas de gestación) si se conoce el sitio de la mutación del LDLR en los alelos paternos o si se conoce el haplotipo del cromosoma con la mutación.

Tratamiento

En el caso de los pacientes adultos con **HCF heterocigota**, se podrían usar, idealmente, agentes que disminuyan el nivel plasmático de colesterol, a fin de aumentar la expresión de LDLR. Este aumento es aún más pronunciado cuando se usan agentes inhibidores de la síntesis de colesterol, forzando de esta manera a la célula a usar únicamente el colesterol-LDL.

La primera clase de drogas basadas en este sistema regulatorio son las *resinas de unión a ácidos biliares* (colestiramina y coestipol) (Fig 12.7, panel del medio). Estos agentes disminuyen el LDL-C entre un 10-20% en pacientes heterocigotas para HCF y en otros estados hipercolesterolemicos. Las resinas de intercambio iónico unen los ácidos biliares a nivel de la luz intestinal,

evitando que absorción desde el ileum. El aumento en la excreción fecal de ácidos biliares desencadena un aumento en la conversión de colesterol a ácidos biliares en el hígado. En respuesta a la deficiencia de colesterol, el hígado responde aumentando la producción de LDLR. Estudios realizados con animales de experimentación sugieren que esto ocurre a través de la proteólisis de SREBP-2 (Fig. 12.4).

Se observó también que el hígado compensa parcialmente la caída en LDL-C aumentando la síntesis intracelular, lo que parcialmente bloquea el aumento en la expresión del LDLR. El hígado también aumenta la síntesis de VLDL, lo cual puede llevar a un aumento en la trigliceridemia en algunos pacientes. Por estas razones, los individuos HCF-heterocigotas con Hipertrigliceridemia no deben ser tratados con resinas de ácidos biliares.

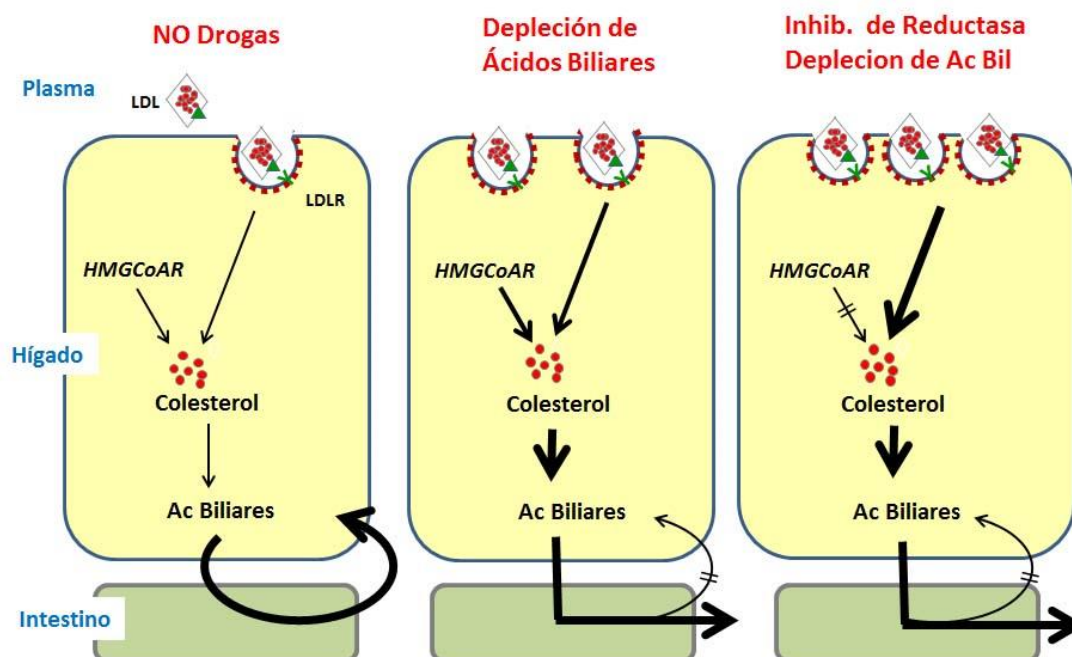


Figura 12.7. Efecto del tratamiento con resinas de unión a ácidos biliares (figura del medio) y/o inhibidores de HMGCoAR (figura de la derecha) en el tratamiento de pacientes HCF heterocigota. Adaptado de Scriver 2002

Se puede considerar que el uso de inhibidores de la síntesis de colesterol intracelular debería actuar en forma sinérgica con el uso de las resinas. Se han desarrollado agentes que actúan como potentes *inhibidores competitivos de la HMGCoAR*, la enzima que controla el paso limitante de velocidad en la síntesis de colesterol: lovastatina, aislada de una especie de *Aspergillus*, dos modificaciones químicas de la primera, pravastatina y sinvastatina, y tres *estatinas* sintéticas (fluvastatin, cerivastatin, and atorvastatin) (Fig. 12.7, panel derecho).

Inicialmente, los inhibidores de HMGCoAR bloquean la síntesis hepática de colesterol e inducen dos respuestas compensatorias: a) aumentan la síntesis hepática de HMGCoAR y b) aumentan el número de LDLR, a través de la inducción de la transcripción. Una vez alcanzado un nuevo estado estacionario, el aumento en la HMGCoAR es suficiente para sobrepasar el bloqueo inducido por el inhibidor. Como consecuencia, el tamaño del pool de colesterol corporal total y la

velocidad de producción no cambian apreciablemente, no obstante, los niveles de LDL plasmático caen debido al aumento en LDLR, aunque se establece un balance en el que la cantidad absoluta de colesterol que entra al hígado vía LDLR es la misma que al principio. La diferencia es que ahora la entrada de colesterol ocurre a niveles de LDL-C más bajos. Por lo tanto, el efecto neto más importante de los inhibidores de HMGCoAR es disminuir la concertación de LDL plasmática sin alterar marcadamente los niveles de colesterol en el hígado u otros tejidos. Se puede esperar que la disminución en los niveles de LDL lleve a una disminución en la cantidad de colesterol en áreas de deposición anormal, tales como los xantomas tendinosos o ateromas, los que dependen de los altos niveles de LDL para su formación.

El efecto más importante de los inhibidores de la reductasa es estimular el clearance, mediado por LDLR, de las lipoproteínas que contienen apo-B ricas en TG, que son los precursores de LDL, de tal manera de reducir la velocidad de producción de LDL.

El tratamiento de los pacientes HCF-heterocigota con estatinas se asocia con una reducción del 50-60% en los niveles plasmáticos de LDL-C. Cuando se da en conjunto con resinas, los inhibidores de la reductasa bloquean el aumento compensatorio en la síntesis de colesterol, y el incremento en los LDLR es aún más pronunciado. El defecto molecular específico del LDLR no parece ser importantes en la respuesta terapéutica a estos agentes.

El tratamiento con inhibidores de la reductasa se asocia con una caída en los niveles de TG plasmáticos y un leve aumento en los niveles de HDL-C, estos efectos son probablemente debido al aumento asociado con el clearance de VLDL y de IDL, más que a cualquier efecto sobre la síntesis de VLDL.

La restricción dietaria se recomienda en cualquier persona con hipercolesterolemia. Es importante, en el caso de pacientes con HCF, identificar y tratar a los miembros de su familia que estén afectados, para lo cual hay que evaluar sus niveles de LDL-C.

Los pacientes **HCF homocigotas** en general son resistentes a los tratamientos que son efectivos en los pacientes heterocigotas, dado que dichos tratamientos actúan estimulando el gen del LDLR, el cual está ausente o marcadamente reducido en los individuos homocigotas. Los pacientes receptor-negativo muestran muy poca respuesta a la restricción dietaria, el uso de resinas de intercambio, bypass ileal o el uso de inhibidores de HMGCoAR. Los que presentan una mutación asociada con un LDLR parcialmente funcional pueden responder al tratamiento, en general combinado farmacológico, junto con una restricción dietaria.

Por otro lado, se demostró que un tratamiento efectivo para disminuir el colesterol plasmático en los individuos homocigotas es la *plasmaféresis* o *aféresis de LDL* (remoción extracorpórea de partículas que contienen apoB-100 utilizando columnas). El *trasplante de hígado* es posible y efectivo, considerando que más del 70% de los LDLR del cuerpo se encuentran en hígado. Este procedimiento, no solo disminuye el nivel de colesterol plasmático, sino que también restaura la respuesta a las estatinas, lo que requiere de un gen para LDLR normal. El éxito de este tipo de tratamiento ha estimulado los estudios de *terapia génica* dirigidos a incorporar un LDLR recombinante en el hígado. Varios pacientes HCF homocigotas fueron sometidos a este tipo de tratamiento experimental, con resultados variables y no concluyentes, por lo que actualmente este

tipo de procedimientos no pueden ser recomendados para los pacientes con HCF homocigotas. La morbilidad asociada con estos procedimientos es alta, incluyendo infarto agudo de miocardio, trombosis mesentérica y la necesidad de transfusiones sanguíneas.

Un tratamiento efectivo de heterocigotas y homocigotas con HCF podría llevar a reducir y en algunos casos a la regresión de la aterosclerosis coronaria.

Referencias

- Bañares VG, Corral P, Medeiros AM Araujo MB, Lozada A, Bustamante J, Cerretini R, Lopez G, Bourbon M, Schreier LE. Preliminary spectrum of genetic variants in familial hypercholesterolemia in Argentina. *Journal of Clinical Lipidology* (2017) 11, 524–531.
- Consenso de la Sociedad Argentina de Lípidos sobre Hipercolesterolemia Familiar Documento de consenso elaborado por la Sociedad Argentina de Lípidos. (Versión 2015).
- Scriver CR et al. (Eds). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw Hill, 2002.

CAPÍTULO 13

Enfermedades de Almacenamiento Lisosomal

Ana M. Cortizo

Introducción

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal (EAL) constituyen un gran grupo de más de 50 enfermedades metabólicas hereditarias, en la mayoría de los casos ocurren por defectos en la función de enzimas lisosomales específicas. En unos pocos casos, estas patologías se deben a alteraciones en proteínas lisosomales no enzimáticas o proteínas no lisosomales comprometidas en la biogénesis de los lisosomas. La característica común de las EAL es la acumulación en los lisosomas de metabolitos no degradados. La acumulación de estos productos activa cascadas metabólicas patogénicas que llevan a alteraciones multi-sistémicas. El almacenamiento de los productos puede comenzar desde la etapa embrionaria y manifestarse clínicamente como una enfermedad temprana y severa o como una forma fenotípica moderada y de expresión tardía. Es decir la expresión fenotípica es muy variable y depende de la macromolécula específica acumulada, del sitio de producción y degradación del metabolito en cuestión, de la expresión residual de la enzima involucrada y del *background* genético del paciente. Otra característica de estas enfermedades es que todas tienen manifestaciones neurológicas.

La Tabla 13.1 resume las principales clases y tipos de EAL, basados en el defecto molecular.

Tabla 13.1

Tipo de EAL	Enfermedad	Defecto	Material almacenado
Mucopolisacaridosis (MPS)	- MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie) - MPS II (Hunter) - MPS III (Sanfilippo A-D)	-Iduronidase Iduronate sulphatase Heparan-N-sulfatasa Acetil glucosaminidasa Acetil-CoA: -glucosamido acetiltransferasa N-acetilglucosamina-6-sulfatasa AcetilGalactosa-6-sulfatasa	GAGs: DS, HS DS, HS HS
	- MPS IV (Morquio)	□Galactosidasa	KS, CS

	A,B) - MPS VI (Maroteaux–Lamy) - MPS VII (Sly) - MPS IX (Natowicz)	Acetil galactosamine 4-sulphatase □-Glucuronidase Hialuronidase	DS DS, HS Hialuronano
Esfingolipidosis	- Fabry - Gaucher (I, II, III) - Krabbe - Niemann–Pick (A, B) - Leucodistrofia metacromática - Gangliosidosis	-Galactosidase A Glucosylceramidase b-Galactosylceramidase Sphingomyelinase Arylsulphatase A Hexosaminidasas	Globotriasylceramide Glucosylceramide Galactosylceramide Sphingomyelin Sulfatidos Gangliosidos
Oligosacaridosis	- Fucosidosis - Manosidos - Schindler	-Fucosidase Manosidasas N-acetylgalactosaminidasa	Oligos ricos Fucosido Oligos ricos Manosa Glicolipidos, glicopeptidos
Glucogenosis	- Glycogenosis II (Pompe)	a1,4-glucosidase (maltase acida)	Glucógeno
Defectos en proteínas lisosomales no-enzimas	- Gaucher - Krabbe - Leucodistrofia metacromática	Saposina C Saposina A Saposina B	Glucosylceramide Galactosylceramide Sulfatidos
Lipidosis	- Wolman/CESD	Acid lipase	Esteres de Colesterol
Defectos proteínas transmembrana	Niemann–Pick Type C1 o C2	Transportador NPC-1 o NPC-2	Colesterol y Esfingolipidos
Defectos procesamiento pos-traduccional	Deficiencia de Sulfatasa Múltiples	Sulfatasa Múltiple	Sulfatidos, glicolipidos, GAGs

Referencias: GAGs, glicosamino glicanos; DS, dermatan sulfato; HS, heparin sulfato; KS, keratan sulfato; CS, condroitin sulfato

No hay datos **epidemiológicos** en la población mundial sobre las EAL, excepto en algunas poblaciones particulares donde se sabe que existe una prevalencia muy alta, como en la población de judíos Ashkenazi que presentan alta prevalencia de enfermedad de Gaucher, Tay–Sachs y Niemann–Pick. Sin embargo, podemos decir que la incidencia global de las EAL es de 1 : 5000 a 1 : 8000. La mayoría de estas enfermedades se transmiten con un patrón AR, excepto la enfermedad de Fabry y la de Hunter que son X-ligadas.

El **diagnóstico** definitivo de las EAL requiere de consideraciones de las características clínicas y pruebas de laboratorio específicas. En algunos casos es posibles llevar a cabo pruebas de

screening. Por ej., se puede determinar GAG en muestras de orina en el caso de mucopolisacáridosis. También pueden usarse algunas pruebas auxiliares de metabolitos/proteínas séricas en algunas EAL. Por ej., la determinación de creatina kinasa en la enfermedad de Pompe o de quitotriosidasa en la enfermedad de Gaucher. El diagnóstico de laboratorio definitivo requiere del análisis enzimático o molecular específico sobre muestras adecuadas, como leucocitos y/o líneas celulares (fibroblastos de piel y/o linfoblastos). Las pruebas genéticas moleculares pueden confirmar el diagnóstico de EAL y son esenciales para definir el diagnóstico de EAL en casos de alteraciones en proteínas lisosomales no enzimáticas y en el diagnóstico pos-mortem en donde la única muestra disponible es el ADN. Estas pruebas también pueden ayudar en el diagnóstico de pacientes con síntomas clínicos asociados a alguna EAL y actividad enzimática residual. Son también útiles en estudios de correlación genotipo-fenotipo en algunas enfermedades y para identificar a miembros de la familia del probando en alto riesgo de padecer una EAL. Las pruebas genéticas moleculares pueden ayudar también a clarificar el tipo de variante genética y el impacto sobre la presencia de la proteína y sobre la presencia de actividad enzimática residual. Esta información es esencial a la hora de evaluar las opciones terapéuticas, ya sea de reemplazo enzimático o tratamientos farmacológicos alternativos.

Debe tenerse cuidado en la interpretación de las correlaciones genotipo-fenotipo, aun cuando se trata de mutaciones recurrentes, ya que algunos pacientes con la misma mutación puede expresar fenotipos clínicos diferentes. Esto sugiere que existen otros factores, como variantes polimórficas, moduladores génicos o mecanismos que “editan” genes, que podrían llevar a cambios en la función de la proteína y así expresar un fenotipo clínico diferente.

Desde hace algunos años existen **pruebas de screening** para las EAL basadas en muestras de sangre seca, usando métodos fluorescentes. También se han descrito ensayos multiplex de enzimas lisosomales sobre muestras de sangre seca, basados en espectrometría de masa en tándem, de tal manera que es posible introducir programas de *screening* para algunas EAL que son factibles de tratamiento.

Considerando que la mayoría de las EAL son heredadas en forma AR, es importante realizar el **consejo genético**. En este proceso se explica al paciente y a la familia las probabilidades de transmitir o padecer una EAL; la evolución de la misma y las formas en que puede evitarse o aminorarse. Durante este asesoramiento, se explica también sobre los posibles tratamientos disponibles, los riesgos de recurrencia y/o ocurrencia y las opciones reproductivas.

Para las parejas en alto riesgo, puede incluirse **diagnóstico prenatal** sobre vellosidades coriónicas (a las 11-12 semanas de gestación) o amniocitos (a las 16 semanas). El geno-tipeado de los pacientes con EAL también permite identificar a los *carriers* en la familia y a veces es posible predecir el fenotipo en los pacientes.

Respecto a los **tratamientos**, la terapia de reemplazo enzimático es disponible para algunas EAL: Fabry, Gaucher, MPS I, Pompe, MPS II, MPS VI, MPS IVA, MPS VII, LALDEn; mientras que se encuentran en desarrollo para MLD, Krabbe, MPS IIIA, MPS IIIB; Niemann Pick B. Otras formas de tratamiento consisten en inhibir la síntesis del sustrato, por ej para el caso de la enfermedad de Niemann Pick tipo C; o el uso de proteínas chaperonas. Otros métodos en

desarrollo consisten en el trasplante medula ósea o células madre y también la terapia génica basada en ADN o ARNm.

Enfermedad de Fabry

La enfermedad de Fabry es una enfermedad congénita del metabolismo de glicoesfingolípidos que se produce por defecto en la actividad de la enzima lisosomal α -galactosidasa A, y es transmitida en forma ligada al X. Este defecto lleva a la deposición progresiva de glicoesfingolípidos neutros terminados en α -galactosilo en la mayoría de los tejidos viscerales y fluidos corporales.

Los lípidos acumulados son Globotriaosilceramida (Gal-Gal-G-Cer) y Galabiosilceramida (Gal-Gal-Cer), en forma de depósitos birrefringentes que se depositan primariamente en lisosomas del endotelio vascular, lo cual lleva con el tiempo a isquemia e infarto, también se acumulan en células de músculo liso y periteliales del sistema renal-cardiovascular y en menor proporción en las células del RE, miocardio y tejido conectivo, células epiteliales de cornea, riñón, etc., en ganglion y células perineurales del SN autonómico.

Se caracteriza por la presencia de lesiones en la piel conocidas como *angiokeratoma corporis diffusum universale*. La muerte ocurre por falla renal, cardíaca o complicaciones cerebrales.

La incidencia de esta enfermedad es de Incidencia: 1/40.000 a 1/117.000.

Historia

En 1898, dos dermatólogos, Anderson en Inglaterra y Fabry en Alemania, independientemente describieron los primeros pacientes con *angiokeratoma corporis diffusum*. Posteriormente, en estudios *pos mortem* se observaron vacuolas anormales en los vasos sanguíneos en todo el cuerpo, sugiriendo así que esta era una enfermedad de almacenamiento generalizada. Subsecuentemente se estableció la naturaleza lipídica del material almacenado. En 1965 se demostró la naturaleza hereditaria ligada al X recesiva de esta enfermedad. En 1963 se aislaron y caracterizaron dos glicoesfingolípidos neutros del riñón de un hemicigota de Fabry por autopsia, así se clasificó esta enfermedad como una esfingolipidosis. En 1967, Brady demostró que el defecto enzimático era una hidrolasa de galactosilos lisosomal.

Clínica

Hemicigotas afectados clásicamente. Las manifestaciones clínicas resultan básicamente de la deposición progresiva de glicoesfingolípidos en el endotelio vascular. La expresión clínica usualmente ocurre en la niñez – adolescencia pero puede ser hasta la 2da o 3ra

década. Las manifestaciones tempranas incluyen crisis episódicas de dolor severo en las extremidades (acroparestesia), la aparición de lesiones cutáneas vasculares (angiokeratoma), hipohidrosis y opacidad lenticular y corneal características. Los depósitos de lípidos aparecen en el endotelio vascular.

Nervios periféricos: Dolor: se han descrito dos tipos, la acroparestesis (disconformidad constante), y las “Crisis de Fabry episódicas” que dura de minutos a días, un dolor agonizante que arde en palma o plantas del pie, desencadenada por ejercicio, stress, o cambios rápidos en la temperatura y humedad, etc. Con la edad las crisis episódicas disminuyen en frecuencia y severidad. El dolor puede ser tan terrible que el paciente contemple la posibilidad del suicidio. Aparte de esto, los pacientes se quejan de una disconformidad constante en las manos y pies, con parestesia que arde (acroparestesia).

Piel: la angiectasis puede ser una de las manifestaciones más tempranas y puede llevar al diagnóstico en niños. Existe un incremento progresivo con la edad, en el número y tamaño de estas lesiones cutáneas.

Angiokeratoma: lesiones cutáneas, angiectasis (aumenta con la edad el número y tamaño de las lesiones), rojo oscuro - negro azul, puntos en clusters en ombligo, nalgas y rodillas. Existe una leve hiperkeratosis. También involucra la mucosa oral y conjuntiva.

Anhidrosis o más comúnmente hipohidrosis es un descubrimiento temprano casi constante.

Corazón: Con la edad, los síntomas de morbilidad más importantes resultan de la deposición progresiva de glicoesfingolípidos en el sistema cardiovascular. Descubrimientos tempranos son el agrandamiento ventricular izquierdo, compromiso valvular, anomalías de conducción. Hay anomalías electrocardiográficas, isquemia e infarto. La enfermedad cardíaca ocurre en la mayor parte de los hombres hemiciotas. Algunas manifestaciones tardías pueden incluir angina pectoris, isquemia miocárdica, infarto, falla cardíaca congestiva, regurgitación mitral severa.

Cerebro: Las manifestaciones cerebrovasculares resultan primariamente del compromiso multifocal de los pequeños vasos. Ataques isquémicos transitorios, shock, aneurismas, hemiplejía; variaciones en la personalidad, comportamiento sicótico manifiesto con la edad. Los síntomas de morbilidad más importantes resultan de la deposición progresiva de glicoesfingolípidos en el sistema vascular a lo largo de la vida.

Riñón: La deposición progresiva de glicoesfingolípidos en el riñón resulta en proteinuria y otros signos de daño renal. Glóbulos lipídicos birrefringentes con característica “cruz de malta” que se observan en orina por microscopía de polarización. Hay proteinuria, alteraciones en túbulo renal, un gradual deterioro de la función renal, desarrollo de azotemia y falla renal. La muerte ocurre por uremia.

Ojos: Compromiso ocular en la cornea, cristalino, conjuntiva y retina: opacidad corneal, cápsula anterior granular, opacidad lenticular posterior, lineal: La catarata de Fabry es un signo patognomónico en hombres hemiciotas y la mayoría de las mujeres heterociotas. Una fenocopia, inducida por drogas, de la distrofia corneal de Fabry, ocurre por tratamiento con cloroquina a largo plazo o con amiodarona.

Visceras: alteraciones pulmonares, varicosidades y hemorroides, diarrea episódica y alteraciones gastrointestinales. Anemia debida a disminución de supervivencia del GR. Pueden observarse macrófagos “espumosos” cargados con lípidos en la médula ósea.

Alteraciones del músculo esquelético. Deformidades permanentes características derivadas de alteraciones en las articulaciones interfalángicas distales de los dedos.

Retardo de crecimiento, facia de tipo acromegálica (sin explicación).

Linfedema de las piernas, debido a deposición de glicoesfingolípidos en los vasos linfáticos y nódulos linfáticos.

Hemicigotas Atípicos. Se han descrito pacientes asintomáticos a la edad en que los clásicos lo son, que se identificaron fortuitamente debido a otros problemas médicos. Existe una actividad de α -galactosidasa residual, compatible con su fenotipo moderado (Variantes Genéticas). La mayoría de estos pacientes son diagnosticados por manifestaciones cardíacas (alteraciones electrocardiográficas consistente con cardiomiopatía) y la mayoría con proteinuria moderada.

Heterocigotas. Estos pacientes son asintomáticos, sin embargo, a medida que aumenta la edad, pueden experimentar algunos síntomas menores. Por ej., distrofia corneal (70%), angiokeratomas (30%), acroparestesis (<10%), hipohidrosis, almacenamiento cardíaco, almacenamiento en SNC y falla renal (<1%). Los heterocigotas obligados (hijas de hombres hemicigotas) pueden no tener ninguna manifestación clínica. Se han descrito mujeres gemelas monocigóticas, una sintomática y la otra asintomática. Esta variabilidad es de esperarse en mujeres heterocigotas para enfermedades X-ligadas debida a la inactivación del X al azar (tempranamente en la embriogénesis). A nivel celular las mujeres heterocigotas para la mayor parte de los defectos enzimáticos X-ligados tienen dos poblaciones celulares, unas con la actividad enzimática normal y la otra mutante. Esto puede detectarse en fibroblastos de piel, donde unos presentan un fenotipo normal y otros el fenotipo alterado.

De 150 heterocigotas reportadas, el compromiso corneal es la más frecuente y comúnmente la única manifestación encontrada. Ocasionalmente pueden existir lesiones de piel, otras alteraciones son menos frecuentes.

Patología

Morfológicamente, la enfermedad de Fabry está caracterizada por depósitos en todo el organismo de glicoesfingolípidos cristalinos con birrefringencia bajo luz polarizada, con aspecto de “cruz de Malta”. Se depositan en todas las áreas del cuerpo, principalmente lisosomas de células del músculo liso, periteliales y endoteliales de los vasos sanguíneos y en menor grado en células reticulares e histiocitos. (Esto es bien diferente de otras lipidosis). También en células epiteliales de la córnea y en túbulos y glomérulo renal, en fibras del músculo cardíaco y en células ganglion del SN autónomo. No se encuentran en hepatocitos o en los sinusoides del hígado.

Existen métodos específicos para fijar estos lípidos y observarlos por microscopia de luz. Puede realizarse una coloración PAS específica para glicoesfingolípidos neutros y prueba positiva de esfingosina, para la identificación química de lípidos acumulados. También se los puede colorear con una lectina de *Banderae simplicifolia* marcada con peroxidasa o una sonda fluorescente, que es específica para residuos α -D-galactosilo. Además, se han desarrollado anticuerpos para este glicolípido. A nivel de microscopia electrónica, pueden observarse inclusiones lamelares concéntricas con bandas alternativas oscuras y claras, intralisosomales, que se asemejan a cuerpos de cebra o capas de cebolla.

Defecto metabólico

Naturaleza de los glicoesfingolípidos acumulados. La actividad deficiente de α -galactosidasa A lleva a la acumulación de glicoesfingolípidos neutros con restos α -galactosilo terminales en los lisosomas de la mayoría de los tejidos no neuronales y en fluidos corporales. Normalmente estos compuestos se encuentran en las membranas plasmáticas y en LDL (70%) y HDL (30%) (en los enfermos aumenta de 3-10 veces en circulación) y algunas membranas intracelulares como Golgi y lisosomas.

Se acumulan principalmente (Fig. 13.1):

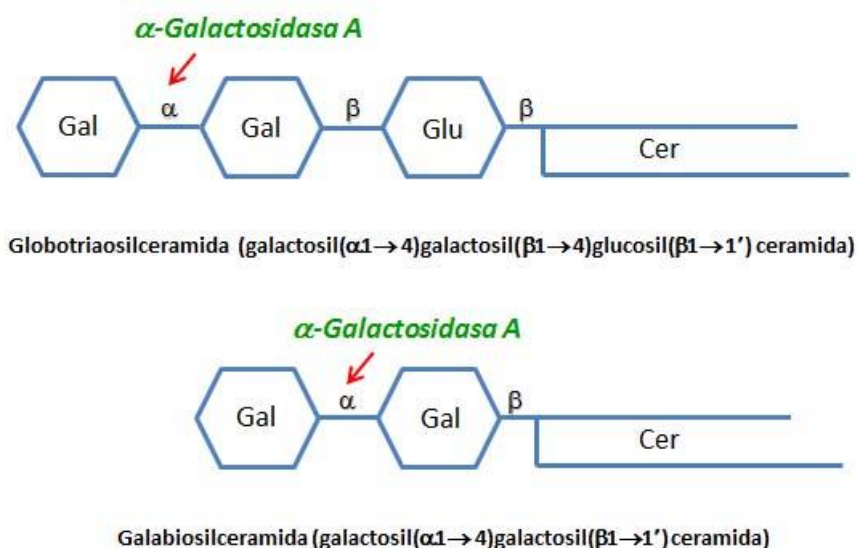
(1) Globotriaosilceramida: Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)Glc(β 1-1')Cer.

La magnitud de acumulación es 30-300x el normal, mayormente en riñón, nódulos linfoides, corazón, próstata, músculo estriado y ganglio autonómico.

(2) Galabiosilceramida: Gal(α 1-4)Gal(β 1-1')Cer.

Acumulación específica de tejido; solamente en riñón, páncreas, corazón derecho, pulmón y sedimento urinario.

Figura 13.1



Biosíntesis de Glicoesfingolípidos. Los glicoesfingolípidos neutros son sintetizados por reacciones enzimáticas secuenciales que incluyen la adición de a pasos de unidades de monosacáridos unidos a aceptores que luego son los sustratos para las siguientes enzimas en la vía.

La enzima de síntesis de glicosfingolípidos es específica de tejido y su regulación depende del tejido, determinando así la cantidad de glicoesfingolípidos específicos que se acumulan en esta enfermedad. Así, α -Galactosiltransferasa se expresa en riñón, no en cerebro, por lo que no hay alteraciones neuropáticas en esta enfermedad, dado que no se acumula galabiosilceramida en cerebro. Mientras que la enzima que sintetiza Galabiosilceramida, se expresa en riñón, pero no en cerebro, bazo o pulmón. Los glicosfingolípidos neutros son sintetizados primariamente en hígado y se transportan unidos a lipoproteínas plasmáticas. El hígado y la médula ósea son las fuentes primarias de síntesis de glicosfingolípidos plasmáticos.

Catabolismo. Los glicoesfingolípidos son degradados en una forma de a pasos por una familia de exoglicosidasas específicas con pH óptimo ácido, lisosomales pero no exclusivamente.

α -Galactosidasa. Se observó que los paciente hemocigotos tenían una actividad residual, que es termoestable y no inhibible por mio-inositol. Esta forma B se ha identificado como una α -N-acetil galactosaminidasa. El 80-90% de la actividad en los individuos normales es termosensible e inhibible por mio-inositol, por esto se las llamó originalmente α -galactosidasa A y B. La α -galactosidasa se purificó por afinidad usando Sefarosa-ConA = para glicoproteínas con Man, a pH 6, dado que es muy inestable a pH > 7 y < 5 . Luego se usó DEAE-celulosa para separar las formas A y B. La α -galactosidasa A tiene un Mr = 101 kDa por SDS-PAGE, con una banda difusa de 49 kDa (homodímero). Presenta una cadena de oligosacáridos de Man. Por isoelectroenfoque pueden verse formas múltiples y diferencias dependiendo del tejido, con pI = 4.3 - 5.1. Las multiformas se deben a diferencias en el contenido en ácido siálico. La forma plasmática tiene 10-12 residuos de ácido siálico, mientras que la de tejidos 1-2 restos de ácido siálico, por lo que la vida media de la primera es mayor.

La α -galactosidasa A es lábil al calor, presenta un pH óptimo de 4.6 cuando se usa como sustrato 4-metilumbeliferil- α -D- galactopiranososa, con un Km = 2 mM y número de turnover = $6 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$. El ensayo de actividad *in vitro* requiere el agregado de un detergente como taurocolato de sodio. Se sabe que *in vivo*, su actividad requiere de proteínas activadoras (*Sffingomielia activating protein*, SAP): SAP-1, que se aisló de hígado y su defecto determina una enfermedad semejante a la leucodistrofia metacromática; SPA-2, su deficiencia conduce a un fenotipo igual a la enfermedad de Sandoff.

En fibroblastos en cultivo, α -galactosidasa A se sintetiza como un precursor de 50 kDa, mientras que la forma lisosomal madura es de 46 kDa. En el RE sufre modificaciones pos traduccionales y adquiere restos de Man. Posteriormente en el Golgi se fosforila, de tal forma que puede ser unida al receptor específico de Man-6-P/IGF-II-R para su transporte, vía vesículas de transporte, a los lisosomas, donde hidroliza diferentes sustratos terminados en α -galactosilo.

Se han identificado varias categorías de **mutaciones** en el gen de la α -galactosidasa por análisis bioquímico e inmunológico.

- Hemicigotas clásicos sin actividad enzimática o proteína enzimática.
- Hemicigotas clásicos sin actividad enzimática, pero proteína enzimática detectable.
- Hemicigotas atípicos con actividad residual.

Existen también pacientes que sintetizan precursores mutados, que son inestables y no se pueden detectar en las células. Otros pacientes presentan una mutación que retarda el transporte desde el RE al Golgi y a los lisosomas, por lo tanto son heterocigotas en la mutación del gen estructural.

Genética molecular de la α -galactosidasa. El locus de α -galactosidasa A comprende la zona Xp22.1 del cromosoma X. Hay un precursor no glicosilado de 48772 Mr y la forma madura de 45,356. Incluye un péptido señal para el precursor de Mr 50,5 kDa y el análisis de secuencia muestra 4 posibles sitios de N-glicosilación.

La mayoría de los cDNA de α -galactosidasa aisladas les falta la secuencia no traducida del 3'. Posee muy poca homología de secuencia con otras enzimas lisosomales, excepto con α -fucosidasa (525 homología de pb). Se conoce la organización estructural del gen α -galactosidasa, con sus elementos regulatorios. El gen tiene aproximadamente 12 kb y contiene 7 exones. Estudios estructura-función de α -galactosidasa A humana revelan que la enzima posee un Asp o Glu en el sitio activo.

La disponibilidad de un cDNA de longitud completa para la enzima ha permitido la investigación de la naturaleza y frecuencia de las mutaciones que causan la enfermedad de Fabry. Las técnicas empleadas para analizar las lesiones moleculares incluyen Southern and Northern hibridización, estudios de RNasa A, amplificación enzimática de mRNA genómico y por transcripción reversa.

Rearreglamiento génicos: Analizando 165 pacientes no relacionados, se identificaron una duplicación parcial del gen y 5 deleciones parciales del gen.

Inserciones y deleciones pequeñas: Se han identificados 6 deleciones de 2-53 bp y 3 inserciones pequeñas de 1-2 bp. Cada uno de estos re-arreglamiento resulta en corrimientos en el marco de lectura que llevan a la terminación prematura de la cadena. Se han detectado en los hemicigotas clásicos, con excepción de una deleción asociada con un fenotipo moderado de expresión tardía.

Defectos en el procesamiento del RNA. Se han descrito 3 mutaciones que alteran el procesamiento del transcrito de α -galactosidasa A.

Mutaciones en la región codificante: Aproximadamente 75% de las mutaciones que causan la enfermedad de Fabry son mutaciones *missense* o *nonsense*. La mayoría aparecen en el exón 5 al 7, mientras que una minoría se encuentran en el exon 1-4. La mayoría se han detectado en los pacientes hemicigotas clásicos, aunque algunas mutaciones *missense* se detectaron en la variante asintomática o moderada para la enfermedad de Fabry. La alta frecuencia de mutaciones en el dinucleótido CpG es consistente con su reconocimiento como un “punto caliente” de mutaciones debido a la deaminación de metilcitosina a timidina.

Lesiones moleculares comunes en la Enfermedad de Fabry: La mayor parte de las mutaciones reportadas con “privadas”, es decir, confinadas a un pedigree Fabry simple.

Correlación Genotipo/Fenotipo. Todos los hemocigotas asintomáticos o atípicos moderadamente afectados tienen mutaciones *missense* y expresan una actividad de α -galactosidasa residual. Encontrar una correlación ha sido difícil pues la mayoría de los enfermos de Fabry tienen mutaciones privadas.

Patofisiología

El depósito de globotriaosilceramida en células endoteliales y del músculo liso es único en esta enfermedad. Sin embargo, el origen de la acumulación de sustratos glicosfingolípidos no se ha clarificado completamente. La distribución celular y tisular única de globotriaosilceramida, particularmente en el endotelio de los vasos y en las células del músculo liso, sugiere que una contribución intracelular significativa puede ser derivada por endocitosis o difusión de globotriaosilceramida desde la circulación, donde la concentración es de 3 a 30 veces más alta que en los individuos normales. En los hemocigotas de Fabry y en los individuos normales, globotriaosilceramida circulante es transportado en la fracción de LDL y HDL. Los glicosfingolípidos sintetizados en el hepatocito son secretados en LDL (70%) y HDL (30%). Pacientes con hipercolesterolemia tienen un aumento proporcional de LDL y glicosfingolípidos neutros. Desde la circulación, los glicosfingolípidos son tomados por las células vía captación mediada por receptores de lipoproteínas de alta afinidad (LDLR) donde se acumulan en cuerpos multivesiculares. Los glicosfingolípidos también se sintetizan en la médula ósea, donde se incorporan en las membranas de los elementos sanguíneos. Así, la cantidad total de glicosfingolípidos almacenados en un dado tejido depende del tiempo, la velocidad de acumulación de fuentes intracelulares y circulatorias, la posibilidad de excreción, y la presencia o ausencia de actividad de α -galactosidasa residual.

Diagnóstico

Consejo genético debe darse a todas las familias con diagnóstico de enfermedad de Fabry. La herencia de hemocigotas y heterocigotas debe ser considerada dado que ambos transmiten el gen e identificar a las mujeres heterocigotas en alto riesgo.

Evaluación Clínica. debe evaluarse la historia clínica, las lesiones de piel características y la distrofia corneal y otras manifestaciones clínicas (Tabla 13.2.), a fin de identificar a los hemocigotas. En niños los primeros síntomas son la fiebre recurrente asociada a dolores en manos y pies; luego aparecen las lesiones cutáneas típicas a la histología y ultraestructura. Esta patología debe

diferenciar se otras condiciones con síntomas clínicos similares. Por ej. Fiebre reumatoidea, Artritis, Fibromialgia, Dermatomiositis, Eritromelalgia, Síndrome de Osler’s, Enfermedad Neuropsicológica, Enfermedad de Meniere, Otros (esclerosis focal y segmentaria, Raynaud, “dolores de crecimiento”, etc)

Tabla 13.2.

Órgano afectado	Signos y/o síntomas
Riñón	Proteinuria Insuficiencia renal
Corazón	Cardiomiopatía Agrandamiento ventricular izquierdo Angina de pecho, infarto, isquemia
Sistema Nervioso	Acroparestesias, crisis de dolor Cefalea, vértigo, tinnitus (silbidos en los oídos) Accidentes cerebrovasculares Depresión, ansiedad
Piel	Angioqueratomas Edemas Hipohidrosis
Ojo	Cornea verticillata Tortuosidad vascular
Sistema Gastrointestinal	Dolor abdominal, diarrea
Oído	Pérdida auditiva
Sistémica	Fiebre, Intolerancia al calor y ejercicio

Puede hacerse un *diagnóstico presuntivo* de hemicigotas por la distrofia corneal y las inclusiones birrefringentes en sedimento urinario y diferenciarse con otras posibles alteraciones. Mujeres heterocigotas pueden presentar opacidad corneal, lesiones cutáneas aisladas y células con lípidos en biopsia de piel y tejidos o el sedimento urinario. Debe considerarse también la existencia de *variantes genéticas*, que presentan manifestaciones clínicas moderadas, con actividad enzimática residual. La α -galactosidasa se puede detectar en fibroblastos en cultivo y diferentes glicosfingolípidos en el sedimento urinario. Dentro de todas las enfermedades lisosomales, esta es la de más lento progreso clínico.

Diagnóstico Bioquímico. El *diagnóstico confirmatorio* se realiza demostrando la deficiencia en la α -galactosidasa A en plasma o suero, también es posible en muestras de sangre seca recogidas sobre papel, o en muestras de leucocitos, lágrimas o biopsia de piel (cultivos de fibroblastos). El ensayo debe realizarse en presencia de N-acetilgalactosamina a fin de inhibir la actividad de α -galactosidasa B. Por ejemplo, Caudron et al usaron un ensayo fluorométrico para evaluar la actividad de α -galactosidasa en manchas de sangre seca tomadas sobre papel

de filtro (Fig. 13.2). Todos los pacientes hemicigotas afectados tenían actividad muy baja, mientras que las mujeres heterocigotas presentaban una actividad de alrededor del 40% de los individuos controles.

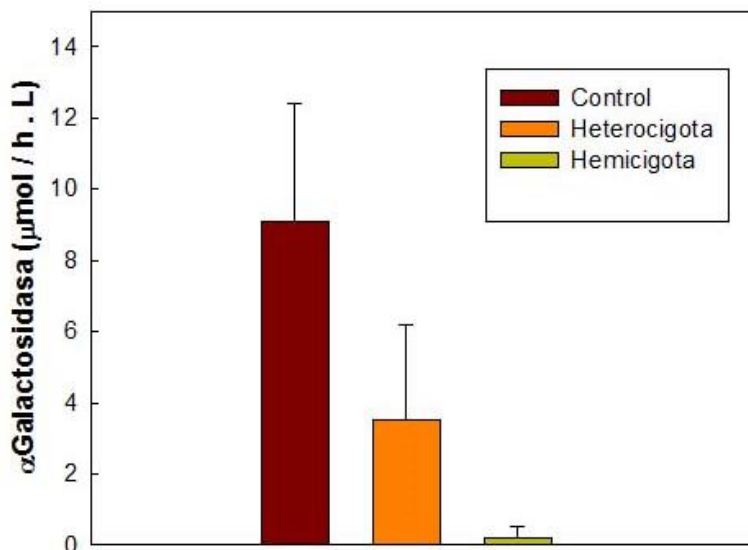


Figura 13.2. Actividad de enzima α Galactosidasa en muestras de sangre seca de Controles (n=8) y pacientes de Fabry heterocigotas (n=68) y hemicigotas (n=60). La actividad se expresó como la media \pm DS. Adaptado de los datos de Caudron et al., 2015.

Los individuos hemicigotas atípicos pueden presentar una actividad enzimática residual de 5-35 % del valor normal. Por otro lado, los individuos con formas variante atípicas pueden presentar niveles bajos (2-10%) y altos (30 %). Para el diagnóstico es también posible evaluar:

- Niveles de globotriaosilceramida en fluidos.
- Actividad residual de la enzima

Diagnóstico Molecular. La identificación bioquímica de mujeres heterocigotas es más difícil debido a la inactivación al azar de uno de los cromosomas X. Se puede determinar la actividad de α -galactosidasa (50% del normal) de varias fuentes, pero eventualmente su actividad puede variar de 0 – valores normales. Otro factor a considerar es que durante el envejecimiento el cromosoma X puede ser reactivado, o puede ocurrir una disminución en los niveles de metilación del cromosoma X, lo cual podría llevar a que los valores enzimáticos se encuentren entre el límite superior de los heterocigotas y el valor normal. En tal caso es posible realizar el análisis molecular usando cDNA de α -galactosidasa o secuencia de DNA anónimos ligados al X. También pueden usarse enzimas de restricción específicas o sondas oligomeras sintéticas para determinar rearrreglamentos génicos, alteraciones en el sitio de ruptura de una endonucleasa o determinar mutaciones puntuales. Sin embargo, de las familias con enfermedad de Fabry solo el 5% que tienen rearrreglamentos génicos o alteraciones en los sitios de restricción. Es posible usar métodos

indirectos por análisis de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) específicos de α -galactosidasa, RFLP para zonas del DNA-cromosomas X anónimos ligados al locus de la enzima.

Diagnóstico prenatal

- Ensayos de α -galactosidasa en vellosidades coriónicas obtenidas a los 9-10 semanas de gestación o en células amnióticas obtenidas a las 15 semanas de gestación.

El diagnóstico requiere la demostración de deficiencia de la enzima y el cariotipo XY.

Tratamiento

Manejo médico. La cronicidad de los eventos clínicos en estos pacientes lleva a debilidad severa y a discapacidad, principalmente debida a los dolores tan insoportables. Se han evaluado varias drogas, aunque los analgésicos convencionales no son efectivos. Se utilizan tratamientos farmacológicos profilácticos, a bajas dosis como son las difenil hidantoínas. Con respecto a las manifestaciones cardiacas, pulmonales, gastrointestinales y del sistema nervioso central, los tratamientos son generales y sintomáticos. Se recurre a diálisis y trasplante renal en casos terminales.

Consejo genético y familiar. Debe considerarse que la enfermedad se transmite como un rasgo ligado al X, de tal manera que:

100 % de los hijos hombres de un padre hemicigoto serán no afectados

100 % de las hijas mujeres de un padre hemicigoto serán Heterocigota obligados del gen (Fig. 13.3). Por otro lado, puede estimarse que una mujer heterocigota, podría tener la mitad de sus hijos varones enfermos y la mitad de sus hijas mujeres hetrocigotas para la enfermedad.

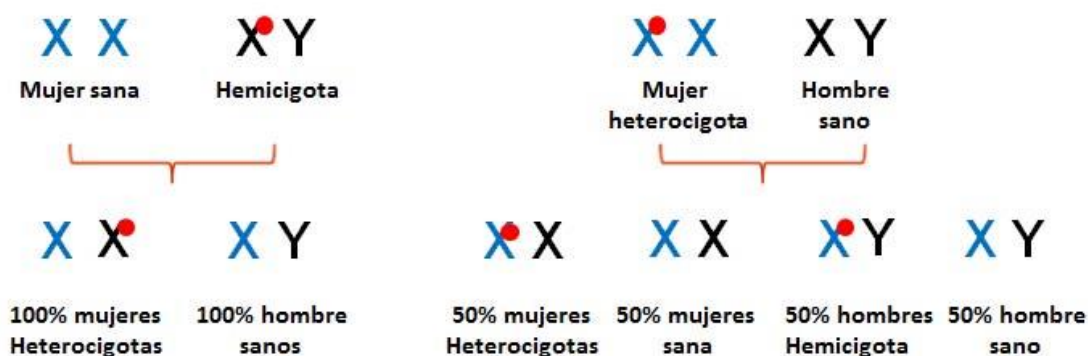


Figura 13.3. Probabilidades de transmisión del gen mutado para α -galactosidasa (indicado con un punto rojo) a la descendencia, según se trate de un hombre enfermo con la enfermedad de Farby o una mujer heterocigota.

También debe considerarse que la mujer heterocigota es un “mosaico” y tendrá dos tipos de células en cada tejido, unas normales y otras con la mutación, dependiendo de si el cromosoma X que se inactiva es el mutado o el norma, respectivamente. Por lo tanto las manifestaciones

clínicas en la mujer heterocigota y en un tejido en particular, dependerán de la proporción de células normales o mutadas que contenga.

La mejor terapia es la prevención, así debe darse también un consejo vocacional para hemigotas jóvenes: descartar ocupaciones que requieran destreza manual, física, stress emocional o exposición a cambios rápidos en la temperatura y humedad.

Reemplazo de Enzimas y Estrategias para depleción de sustratos: Puede indicarse plasmaféresis crónica, flebotomía crónica.

Haciendo estudios in vitro con fibroblastos en cultivo se observó que si se agregaba la enzima al medio de cultivo, era tomada por las células, en un proceso dependiente de los receptores de IGF-II/Man-8-P. Así es posible una estrategia de tratamiento específico de reemplazo enzimático en los pacientes de Fabry. Este tratamiento se basa en la infusión intravenosa de una α -Glicosidasa A humana recombinante. Actualmente existen dos productos disponibles comercialmente: Agalsidasa alfa (de Shire Human Genetics, ex TKT Inc) y Agalsidasa beta (de Genzyme). Se ha demostrado el efecto beneficioso de este tratamiento sobre diferentes órganos y sistemas de los pacientes de Fabry. Por ej., mejora la función renal o la estabiliza, disminuye la cantidad de globotriaosil ceramida en sedimento urinario y en tejido renal; reduce las acroparestesias y mejora la tolerancia al calor y ejercicio; disminuye el dolor abdominal y frecuencia de diarrea; mejora la capacidad auditiva y la calidad de vida.

Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher es el desorden de almacenamiento lisosomal de mayor prevalencia, es una enfermedad hereditaria derivada del catabolismo de glucosilceramida debida a la deficiencia de glucosilcerebrosidasa lisosomal o β -glucosidasa (GBA). La deficiencia resulta en acumulación de glucosilceramida en macrófagos del sistema retículo endotelial, que se convierten en células de Gaucher. La enfermedad se transmite en forma AR.

El primer ejemplo fue un paciente con hepatoesplenomegalia descrito en la tesis doctoral de Phillipe C E Gaucher en 1882.

Fisiología

La GBA codificada en el brazo largo del cromosoma 1 (región 1q21), formado por 11 exones. Existe un pseudogen (GBAP), ubicado 16 kb corriente abajo del gen GBA, con >96% de identidad con GBA y que no origina ninguna proteína funcional; la diferencia en las estructuras es la presencia de varias inserciones *Alu* en los intrones de GBA y un gran número de deleciones en el GBAP.

La β -Glucocerebrosidasa es una enzima unida a membrana, que posee un pH óptimo 4.5 - 6.0, es lábil al calor, estimulada por taurocolato y inhibida por conduritol β epóxido (CBE)

En base a análisis cinético de activadores e inhibidores de GBA se han propuesto tres dominios del sitio activo:

- 1) Sitio catalítico: región hidrofóbica que reconoce el cuerpo de β -glucosilo y CBE
- 2) Sitio aglicona: sitio hidrofóbico que une sustratos alkil o acil y algunos inhibidores
- 3) Sitio alostérico: dominio hidrofóbico que une fosfolípidos activadores e inhibidores análogos de esfingosina.
- 4) Sitio de unión a proteínas activadoras

Existe una proteína que estimula la enzima en bazo y otros tejidos, estable al calor, se la llama coglucosidasa o proteína activante de sfingolípidos-2 (SAP-2)

Características clínicas. Clasificación

En base a los signos y síntomas clínicos, se la divide en tres subtipos:

Tipo 1: no neuronopática

Tipo 2: neuronopática aguda

Tipo 3: neuronopática sub-aguda

Las diferencias entre los subgrupos son la presencia y progresión de complicaciones neurológicas. En los tres subtipos los síntomas pueden comenzar en la infancia y la discriminación de subtipos depende de la evolución de las manifestaciones clínicas. Existe una gran heterogeneidad en la presentación, sobre todo en la tipo 1, aun entre pacientes que expresan la misma mutación, lo que hace que su pronóstico sea incierto.

Tipo 1: **Noneuronopática crónica**

- Edad de aparición y severidad de los síntomas es muy variable. Aunque el defecto genético está presente desde la concepción, se diagnostica tardíamente en la vida, aproximadamente a los dos años aunque no hay signos aparentes.
- Entre los judíos Azkenazi, incidencia 1:600 - 1:2500.
- Signos iniciales: esplenomegalia sin dolor, con trombocitopenia, anemia y leucopenia.
- Tiempo de sangría anormal, moretones, hemorragias peri operativa inesperadas
- Moderada disfunción hepática: aumento de las enzimas hepáticas en el suero, disminución del clearance de sulfobromoftaleína.
- Cambios degenerativos esqueléticos: son la causa de discapacidad. Puede haber osteopenia y osteolisis. Dolores episódicos (días - meses) en cadera, piernas, espalda y hombros; estos episodios se denominan “*crisis óseas*”.
- Pigmentación de la piel marrón amarillenta difusa anormal en la cara y las piernas, retardo de crecimiento, menarca y dentición.
- Signos raros: compromiso renal clínico, hipertensión pulmonar, anormalidades cardíacas.

- Esperanza de vida es normal

Tipo 2: Neuronopática aguda

- Presentación más uniforme
- No existe una predilección étnica
- Edad promedio de presentación: 3 meses. Signos: hepatoesplenomegalia
- A los 6 meses: complicaciones neurológicas: compromiso del núcleo del nervio craneal y tracto extrapiramidal. Triada clásica: Trismus, estrabismo, retroflección de la cabeza; acompañada por espasticidad progresiva, signos de Babinski positivos y otros reflejos patológicos.
- Disfagia y dificultades para manejar las secreciones, que llevan a neumonía aspiratoria. Puede ocurrir *seizures* (convulsiones). A medida que progresa el deterioro neurológico, los niños se vuelven apáticos y hay pérdida de movimientos.
- Muerte por apnea o neumonía respiratoria a la edad de 9 meses (1 mes - 2 años).

Tipo 3: Neuronopática subaguda

- Hepatoesplenomegalia que usualmente precede a las anormalidades neurológicas.
- Variabilidad en el compromiso de órganos sistémicos (como en T1). Variabilidad en la edad de aparición de las manifestaciones.
- Anormalidades neurológicas: ataxia, paraparesis espástica, *seizures*, oftalmoplegia supranuclear y demencia.
- Las características neurodegenerativas ocurren a mayor edad que el TII y progresan más lentamente.

El grupo de casos Suizos --> Enfermedad de Gaucher Norbottnian.

Patología

Célula de Gaucher. Se observan células características en retículo endotelial cargadas de lípidos, en tejidos como la pulpa roja del bazo, los sinusoides y la médula de nódulos linfáticos, capilares alveolares y médula ósea. También se encuentran en la adventicia y en la pared íntima de las arteriolas, venas, vasos linfáticos y capilares.

Célula de Gaucher: deriva de histiocitos en el bazo, célula de Kupffer en hígado, macrófagos alveolares en pulmón, osteoclastos y macrófagos de médula ósea y células periadventicias en el espacio Virchow-Robin del cerebro. Poseen los mismos marcadores de superficie y ultraestructura que la línea de células histiocito-monocito y pueden ser vistas en pituitaria, páncreas, tiroides, corteza y médula adrenal, riñón y lámina coroide de los ojos.

Miden de 20 -100 μm , con un núcleo excéntrico y citoplasma como papel arrugado (Fig. 13.4). Dan reacción débil con el reactivo de PAS, fuertemente positiva para Fosfatasa ácida, acumulan glicolípidos que se agregan con proteínas para formar estructuras tubulares. Estas células sirven como criterio diagnóstico, son bien diferentes de las células espumosas de otras lipidosis.

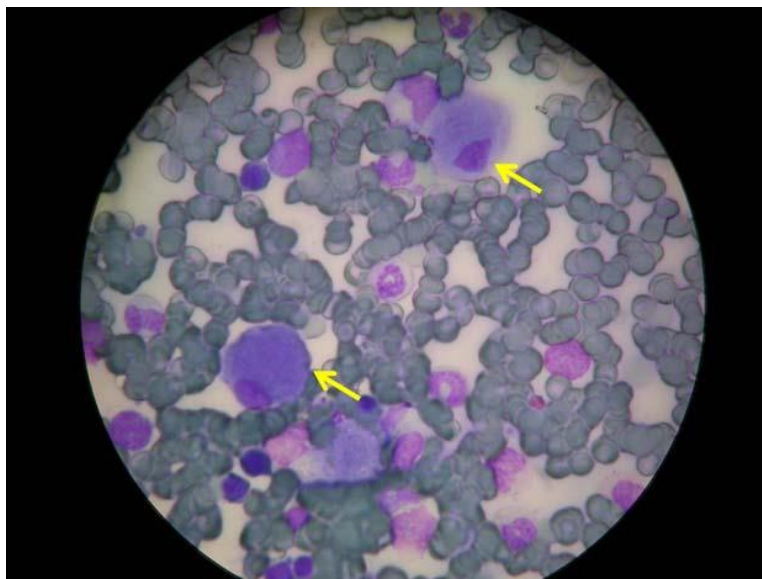


Figura 13.4. Aspirado de medula ósea mostrando las células de Gaucher (flecha)

El principal **lípidos almacenados** en esta patología es Glucosilceramida, que deriva de la ceramida, con un grupo de cabeza polar, de glucosa (Fig 13.5). Este lípido se acumula en diferentes tejidos, en los lisosomas de células del retículo endotelial y también se encuentra en circulación, donde es transportado unidos a lipoproteínas. Puede observarse en los paciente de Gaucher un aumento de 2-10x del valor normal en plasma. En el hígado y bazo el aumenta es de aproximadamente 10-100x. La acumulación es focal y multifocal.

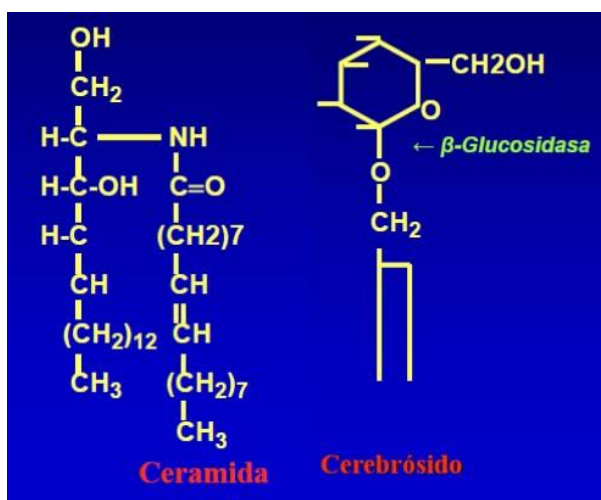


Figura 13.5. Esquema de las estructuras de la ceramida y del glucocerebrosido acumulado en la enfermedad de Gaucher, donde hay una mutación para la enzima que lo hidroliza, la β -Glucosidasa lisosomal.

La patogénesis de esta enfermedad puede explicarse por la acumulación de estos lípidos que llevan a la formación de células de Gaucher, en un proceso multifocal. Esto produce un efecto tóxico para las células de almacenamiento en sí o por falla de los macrófagos cargados con lípidos para detoxificar. Se observó que la captación de glucosilceramida por los macrófagos en

cultivo lleva a la liberación de enzimas lisosomales, interleukinas, factores estimulantes de fibroblastos (FGF) y otros factores derivados de macrófagos, productos que podrían llevar a injuria y muerte de células vecinas y a la estimulación de fibroblastos. La activación aberrante de los macrófagos podría inducir alteraciones en diversos procesos como el tráfico celular y contribuir a la expresión fenotípica de la enfermedad.

Tejidos afectados

Bazo. La esplenomegalia sin dolor es uno de los signos más tempranos. La velocidad de agrandamiento es útil en juzgar la velocidad de progreso de la enfermedad. Se detecta que la supervivencia del glóbulo rojo y plaquetas esta disminuída, existe fibrosis con alteraciones de la arquitectura normal. El bazo se encuentra agrandado, firme y contiene áreas pálidas causadas por infartos. La pulpa roja se ha reemplazada por pulpa blanca que contiene células de Gaucher. La esplenectomía se puede realizar, pero con precaución, pues acelera el curso de la enfermedad.

Sistema Linfático. Aparecen nódulos linfáticos que pueden estar agrandados y contener células de Gaucher.

Hígado. La falla hepática es muy rara. Las células de Gaucher aparecen en los sinusoides. En casos más severos se observa fibrosis, que lleva a la distorsión de la arquitectura, con nódulos regenerativos pequeños infiltrados por células de Gaucher. Los hepatocitos no se hallan comprometidos en el almacenamiento. Hay sitios de hematopoyesis extramedular. Las pruebas de función hepática son anormales, aunque el aumento de la fosfatasa alcalina es debido al compromiso óseo. Puede observarse ictericia, lo cual es un signo serio en esta enfermedad y representa tanto infección intercurrente o hepatitis activa crónica, o falla hepática preterminal.

Hueso. En los subtipos T1 y T2 con frecuencia se presentan anomalías óseas por rayos X, entre el 50 - 70 % de todos los pacientes. Son comunes los dolores articulares o de hueso artrítico. La causa de estas alteraciones está basada en descubrimientos metabólicos y endocrinológicos que muestran un desbalance en la homeostasis del calcio, aunque el esqueleto entero no se haya afectado.

Lesiones: aparece una colección de células de Gaucher dispersas en la medula ósea, que lleva a un proceso tóxico alrededor de estos *foci*: hay edema, compromiso vascular e infarto. El infarto de los huesos se ha denominado “*crisis ósea*”, y afecta más frecuentemente la cabeza femoral y el fémur distal.

La crisis es usualmente autocontenida, tarda normalmente 2 semanas pero puede durar meses; algunas veces se resuelve completamente, pero típicamente se desarrolla una región de osteosclerosis y/o deformación ósea o fractura. Posteriormente puede ocurrir una infección en la región infartada produciendo una verdadera osteomielitis. El almacenamiento de glucosilceramida en macrófagos tisulares puede alterar la generación de osteoclastos competentes y resultar en una falla para mantener una matriz ósea sana.

Sistema cardiovascular. Los pacientes con el fenotipo T1, no presentan compromiso del corazón y pulmones. Un número pequeño de individuos con las formas T1 y T3 presentan enfermedad pulmonar crónica severa sin lesión cardíaca.

Riñón. Existen células de Gaucher en la corteza, médula o glomérulo, pero la función renal es normal.

Sistema gastrointestinal. Se encuentran células de Gaucher en una colección focal en los patch de Peyer y la lámina propia del tracto gastrointestinal. La captación anormal de calcio puede ser uno de los factores severos que afectan el hueso.

Sistema Endócrino. Se observa retardo de crecimiento y de la maduración esquelética en niños. Algunas complicaciones raras pueden ser la deficiencia de hormona de crecimiento e hipotiroidismo. La producción de vitamina D y el metabolismo activo son anormales en pacientes con alteraciones hepáticas severas. En pacientes con el subtipo 1, el calcio urinario se encuentra disminuido (con moderada a severa degeneración ósea) sin aumento de PTH.

Piel. Pigmentación marrón amarillenta difusa en cara y piernas inferiores en niños y adultos. Aunque las células de Gaucher no se encuentran en la piel, se ha descrito un aumento de Fe y melanina.

Ojos. Manchas rojo-cereza de la mácula, comunes en algunas lipodosis, no ocurren en esta enfermedad.

Sistema inmune. Se encuentra deficiencia de linfocitos T en el bazo y sangre periférica. No se demuestran desórdenes inmunes clínicos.

Plasma. Puede detectarse aumento de fosfatasa ácida, enzima convertidora de angiotensina, hidrolasas lisosomales, lisosima e inmunoglobulinas. Hay un aumento de aproximadamente 10x en glucoceramida, que puede llevar a una alteración en la cascada de coagulación.

Sistema Nervioso. Los pacientes con la forma T1 no presentan síntomas clínicos de compromiso del sistema nervioso; pero los que tienen la forma T2 presentan neuronofagia y muerte celular neuronal. La acumulación de glucosilceramida en cerebro lleva a disfunción de células vecinas mucho antes que se vean los cambios patológicos discretos. Lisoesfingolipidos, incluyendo glucosilesfingosina inhibe PK-C, disfunción y muerte neuronal.

Genética

La enfermedad de Gaucher se presenta con una herencia autosómica recesiva. Es una de las formas más prevalentes de esfingolipidosis o desórdenes de almacenamiento lisosomal. La mayor parte de los casos son de T1 o crónico (población general: 1/50.000, Carrier: 1/100; población de judíos Ashkenazi: 1/400, Carrier: 1/10).

El fenotipo de Gaucher T1 es más frecuente entre los judíos Europeos del este, pero menos severa, es más severa entre los individuos de raza negra.

Debido a la alta frecuencia en los Ashkenazi 1:600 - 1:2500 (desorden genético entre los judíos más prevalente), se recomiendan pruebas de carie a gran escala en esta población

Diagnóstico

Homocigotas. Puede hacerse un *diagnóstico presuntivo* en base a la esplenomegalia inexplicada con o sin diátesis hemorrágica u otras manifestaciones de enfermedad esquelética o hepática. En niños, por la presencia de hepatoesplenomegalia y curso neurodegenerativo. También puede ser sugerida por el aumento de fosfatasa ácida no inhibible por tartrato y por la demostración de células de Gaucher en biopsia de médula ósea.

El *diagnóstico confirmatorio* debe hacer a través de la evaluación de la actividad de β -Glucosidasa. Se puede realizar el ensayo en leucocitos, fibroblastos u orina y muestras de sangre seca, usando un sustrato artificial como 4-metilumberil β -D-glucopiranosido, fácil de usar y disponible comercialmente. Además, la actividad enzimática se determina en presencia de sales biliares (taurocolato de sodio) y a pH=5, ya que en leucocitos se encuentran dos isoenzimas. En presencia de sales biliares, se observa una única actividad enzimática, que es mínima en pacientes y máxima en los controles normales.

En el caso de los **carriers** de esta enfermedad, existe algún solapamiento entre controles y carriers para la enzima en leucocitos, los fibroblastos tienen una actividad específica de GBA más alta que los leucocitos, pero un rango más amplio en los normales por lo que sería menos útil.

El **diagnóstico prenatal** puede realizarse usando amniocitos en cultivo o muestras de vellosidades coriónicas para determinar la actividad de β -Glucosidasa.

Diagnóstico Molecular. Mutaciones: se han descrito más de 300 mutaciones en el gen de β -Glucosidasa (GBA). El tipo de mutaciones son *missense*, *frameshifts*, deleciones/inserciones, *splicing*, recombinación gen-pseudogen. Algunas mutaciones (20%) asociadas con esta enfermedad resultan de la recombinación entre ambos genes. Se conocen 4 mutaciones más frecuentes asociadas con la enfermedad de Gaucher:

Mutacion	p.N370S	p.L444P	84GG	IVS2+1
Nombre clasico:	N370S	L444P	84GG	IVS2+1
cDNA	c.1226A>G	c.1448T>C	c.84_85dupG	c.115+1G>A
Proteina	p.Asn409Ser	p.Leu483Pro	Frameshift	Splicing
Frec General %	33	40	5	3
Frec Ashkenazi	75	5.5	11	3.3
Frec Argentina %	46.8	6.5	3.2	

En la población judía Askenazi, el 95% de las mutaciones pueden detectarse en base a las mutaciones más conocidas, mientras que en la población general esto se reduce al 75% aproximadamente.

No es posible establecer una **correlación genotipo-fenotipo**, dado que pacientes con la misma mutación pueden presentar un cuadro clínico muy diferente, desde asintomático a cuadros muy severos. Por lo tanto se considera que habría en la expresión fenotípica de la enfermedad

modificaciones asociadas a interacciones con otros genes y/o factores del entorno. En general la mutación L44P se asocia con un fenotipo Tipo 1, con actividad de β -Glucosidasa residual (7-12%); mientras que la mutación N370S se asocia con un fenotipo más grave, tipo 2 o 3. Es también llamativo los reportes de gemelos monocigotas con fenotipos de Gaucher discordantes, es decir con el mismo genotipo determinado, uno expresando manifestaciones clínicas muy graves y el otro sin manifestaciones clínicas. Un fenómeno que agrega complejidad y variabilidad a la enfermedad de Gaucher es su asociación con la enfermedad de Parkinson. Se ha descrito a través de múltiples estudios un ligamiento génico entre mutaciones de GBA y Parkinson, aunque los mecanismos precisos aun ha sido determinado. Estudios futuros sobre análisis epigenético en la enfermedad de Gaucher podrían ayudar a identificar otros genes o mecanismos involucrados en la variabilidad en estas patologías.

Marcadores biológicos. Seguimiento. Un biomarcador es un indicador de un proceso biológico que está directamente relacionado con las manifestaciones clínicas y evolución de una enfermedad particular. Pueden ayudar en el diagnóstico, en el seguimiento y respuesta a un determinado tratamiento. En el caso de la enfermedad de Gaucher se han propuesto varios marcadores, productos producidos por los macrófagos o células de Gaucher que pueden ser evaluados en los fluidos biológicos. Entre ellas hay varias citoquinas inflamatorias (IL-1, TNF α) y proteínas como fosfatasa acida, α -hexosaminidasa); sin embargo son poco específicas, presentan gran variabilidad individual y así son de poca utilidad clínica.

El mejor marcador para esta enfermedad es la **Quitotriosidasa** plasmática. Aunque no es exclusiva de la enfermedad de Gaucher (esta aumentada en tuberculosis y sarcoidosis entre otras situaciones), es un marcador muy sensible que se detecta con un aumento 100-1000 veces. Es una enzima (glucosaminidasa) expresada y secretada por los macrófagos activados, posiblemente neutrófilos y células de Gaucher, cuya función es hidrolizar la quitina, con acción antifúngica en las plantas, posiblemente capaz de degradar patógenos que contienen quitina (hongos, nematodos e insectos). Se la considera un marcador de inflamación crónica y de proliferación de macrófagos, puede correlacionar con la severidad de la enfermedad de Gaucher, aunque un 20% de los pacientes no expresan actividad de Quitotriosidasa. Además, el 6% de la población sana caucásica tiene un déficit absoluto en la actividad de esta enzima, que se transmite como un rasgo AR y la prevalencia de los heterocigotas “portadores” es del 35%.

Otro marcador es el **PARC**, quimocina de activación y regulación pulmonar, también llamada **CCL18**, de rol fisiológico desconocido. También esta elevado en enfermedades como la sarcoidosis y alergias y entre 10-40 veces respecto a controles sanos, en los pacientes de Gaucher no tratados. Presenta una buena correlación con la actividad de quitotriosidasa plasmática, con el grado de afectación visceral y parámetros hematológicos. Su determinación es más compleja y su costo mayor.

Tratamiento

El tratamiento de la enfermedad de Gaucher tipo 1, farmacológico es sintomático. Considerando que la afectación se origina en la acumulación de glucilceramida, los tratamientos están basados en dos tipos de estrategias: el reemplazo de la enzima deficitaria dirigida a los lisosomas (terapia de reemplazo enzimático) y la reducción en la síntesis de glucosilceramida endógena (terapia de reducción de sustratos).

Reemplazo enzimático. Se utiliza una enzima modificada con restos de Man expuestos, lo que permite a la enzima ir a los lisosomas vía el receptor natural de Man en macrófagos: Actualmente existen en Europa dos preparados comerciales denominados imiglucerasa (Cerezyme) y velaglucerasa (Vprov), que ha demostrado seguridad y eficacia y presenta pocos efectos secundarios.

Respecto a las alteraciones óseas en particular, no existen buenos marcadores biológicos para su seguimiento, la osteopenia se presenta precozmente. En los adultos, se necesita además del reemplazo enzimático el tratamiento con bifosfonatos, de efectos antiosteoclastogénicos y utilizados como droga de primera línea en osteoporosis.

Trasplante de órganos. Puede usarse trasplante de hígado en enfermos con falla hepática y de médula ósea para subtipos sin compromiso neurológico

Transferencia del gen en células somáticas. Se utilizaron retrovirus como vectores para transferir el gen en células en cultivo derivadas de enfermos, en forma exitosa; aunque la expresión en animal entero no fue la esperada.

Mucopolisacaridosis

Las mucopolisacaridosis son un conjunto de enfermedades de almacenamiento lisosomal (7 tipos) debidas a defectos en 11 enzimas lisosomales comprometidas en la degradación de los glicosamino glicanos (GAG), antes denominados mucopolisacaridos (Tabla 13.1). La deficiencia de las enzimas lleva a la acumulación de GAG en los lisosomas de la mayoría de los tejidos, Son enfermedades progresivas y multisistémica, caracterizadas por una incidencia en conjunto de 1/25.000. Los GAG son polímeros no ramificados compuestos por un amino-azúcar (N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina) y ácido urónico: sulfato de heparan, sulfato de condroitina, sulfato de dermatan y sulfato de keratan, y ácido hialurónico.

Manifestaciones clínicas

Neurológicas: los pacientes se pueden presentar diferente grado de retraso en el desarrollo, acumulación de líquido cefalorraquídeo (hidrocefalia comunicante), compresión de médula espinal/mielopatía cervical y síndrome de túnel carpiano/tarsiano.

Oftalmológicas: estas patologías se asocian con glaucoma, degeneración en retina, opacidad corneal y ceguera

Manifestaciones auditivas: están presentes en el 70-100% de los pacientes, obstrucción tubariaca, malformaciones de huesillos, otitis recurrentes, pérdida auditiva (conducción y neural).

Vías respiratorias: hay deformación bronquial y torácica que ocasionan problemas respiratorios, apnea de sueño. Se puede presentar enfermedad pulmonar restrictiva, asma, e insuficiencia respiratoria

Tracto Gastrointestinal: manifiesta con Hepatomegalia/esplenomegalia, diarrea crónica, hernias inguinales/umbilicales

Manifestaciones Cardíacas: asociadas a cardiomiopatías, enfermedad valvular, hipertensión pulmonar y sistémica y falla cardíaca congestiva

Manifestaciones Esqueléticas: la disostosis multiplex que incluye varias afectaciones. La cifoescoliosis se manifiesta tempranamente en los primeros meses de vida: Gibbus deformity

Restricción del movimiento articular, mientras que otras manifestaciones se desarrollan con el progreso de la enfermedad. Se presenta también alteraciones que comprometen la función de la mano, como por ej la rigidez de las articulaciones.

Cada desorden representa un amplio rango de severidad y manifestaciones clínicas. Por ej, dentro de las MPS tipo I, pueden ser desde severas a formas atenuadas, la enfermedad de Hurler se presenta con una expresión en la infancia o niñez temprana, caracterizada por manifestaciones somáticas y neurológicas severas y muerte antes de los 2 años. Por otro lado, la enfermedad de Scheie, se presentan con una inteligencia y estaturas normales, manifestaciones somáticas moderadas, y supervivencia hasta la edad adulta. Ambos síndromes se asociación con la deficiencia de la misma enzima (α -L-iduronidase); se han detectado alrededor de 74 mutaciones diferentes. Varios factores pueden contribuir a la heterogeneidad clínica, la naturaleza o tipo de mutación, el grado de actividad enzimática residual, posibles factores del entorno, factores genéticos desconocidos.

Diagnostico

Es posible detectar GAG en muestras de orina, para lo cual se métodos cuantitativos (DMB, dimetil metilén blue) y cualitativos como el teste de la mancha de Berry y la identificación por cromatografía en capa fina o electroforesis. La confirmación puede hacerse midiendo la actividad enzimática en todos los casos de MPS con diagnostico clínico. Los pacientes con MPS I y II y mutaciones que

predicen no producción enzimática tienen un pronóstico severo. Sin embargo, los pacientes con una actividad residual tan baja como 0.1-0.3%, pueden tener un curso clínico atenuado.

Cuando un paciente es diagnosticado con una MPS, se puede dar un consejo genético, lo cual le dará a la familia información respecto a la genética, herencia, riesgo de recurrencia para las diferentes MPS. Para todas las MPS, la herencia es AR (excepto la de tipo II que es X-ligada) y dos padres portadores poseen un 25% de riesgo de tener otro embarazo afectado. La MPS II, X-ligada, se expresa en pacientes varones, ellos heredan la mutación de su madre o como resultado de una mutación nueva. En el caso de una mujer heterocigota para la mutación, las probabilidades de transmisión son del 25% de tener un varón sano, 25% un varón afectado, 25% de tener una mujer sana y 25% una mujer heterocigota de la mutación (como en el caso de la enfermedad de Fabry, Figura 13.3). Los pacientes varones afectados, le transmitirán la mutación a todos sus hijos varones y a ninguna de sus hijas mujeres.

El análisis de las mutaciones es esencial para la detección de los heterocigotas. El análisis prenatal es posible a través de la determinación enzimática en tejidos obtenidos por aminiosen- tesis o muestras de vellosidades coriales.

Referencias

- Caudron E, Prognon P, Germain DP. Enzymatic diagnosis of Fabry disease using a fluorometric assay on dried blood spots: An alternative methodology. *Eur J Med Genet.* 2015 Dec;58(12):681-4.
- Chamoles, N.A., Blanco, M., Gaggioli, D., 2001. Fabry disease: enzymatic diagnostic on dried blood spot in filter paper. *Clin Chim Acta* 308, 195-196.
- Filocamo M & Morrone A. Lysosomal storage disorders: Molecular basis and laboratory. *Human Genomics.* (2017) 5 (3), 156–169.
- Grabowski GA. Gaucher disease and other storage disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:13-8.
- Hassan S, Sidransky E, Tayebi N. The role of epigenetics in lysosomal storage disorders: Uncharted territory. *Mol Genet Metab.* 2017 Nov;122(3):10-18.
- Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr.* 2004 May;144(5 Suppl):S27-34.
- Rozenfeld PA. Fabry Disease: Treatment and Diagnosis. *Life* 2009, Nov; 61(11): 1043–1050.
- Rozenfeld PA, Tarabuso A, Ebner R, Ramallo G, Fossati CA. A successful approach for the detection of Fabry patients in Argentina. *Clin Genet.* 2006 Apr;69(4):344-8.
- Sanjurjo P & Baldellou A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 4ta Edición. Ergon c Arboleda I 2014.
- Scriver CR et al. (Eds). *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* McGraw Hill, 2002.
- Schiffmann R. Fabry disease. *Pharmacology & Therapeutics* 122 (2009) 65–77.

PARTE V

Alteraciones del metabolismo de metales, hemo y otras vias

CAPÍTULO 14

Metabolismo de Fe - Hemocromatosis hereditaria

Juan Manuel Fernández

Introducción al metabolismo del hierro

El hierro es esencial para la vida y desde los comienzos de la civilización se utiliza en beneficios de la salud humana. Por ejemplo, los egipcios, en los años 1500 a.c, lo utilizaban para hacer un ungüento como tratamiento para la calvicie. En la India, en los años 500 a.c, fabricaban diversos preparados basados en hierro como tratamiento de distintas enfermedades. En el año 1713, Lemery y Geoffry comienzan a establecer las bases científicas para el tratamiento de su deficiencia. Más tarde, en 1832, Blaud genera una pastilla a partir de la mezcla de sulfato ferroso y carbonato de potasio, aunque luego se demostró que esta forma de hierro no se absorbía totalmente ya que lo encontraban en heces. En el año 1920, se demostró que la ingestión de hígado cocido era más eficiente que la píldora de Blaud como tratamiento de regeneración de la sangre. Mas tarde (1937) Castle demostró la eficacia del tratamiento con hierro vía parenteral en la anemia hipocrómica. Entre los años 1943 y 1947, se descubre la transferrina, demostrando el rol de la mucosa intestinal en la absorción del hierro. Pocos años después, en 1950, se concluye y determina la forma de distribución, metabolismo y balance del hierro y a principios de este siglo, se descubre a la Hefcidina.

El hierro puede encontrarse en dos estados de oxidación estables, en estado ferroso (Fe^{+2}) y en estado ferrico (Fe^{+3}), con capacidad para formar parte de varias reacciones bioquímicas. En su forma libre, el Fe puede participar en la reacción de Fenton, ocasionar daños en diversos tejidos, dado que es capaz de generar radicales libres. Estos radicales inducen peroxidación de lípidos, proteínas y ADN (Fig. 14.1), por lo cual el hierro en el organismo se encuentra unido a proteínas. Además, como este elemento es necesario para muchas reacciones bioquímicas, su absorción, concentración y estado redox debe estar muy bien regulados. Se sabe que su deficiencia conduce a anemia, mientras que si esta en exceso se produce siderosis.

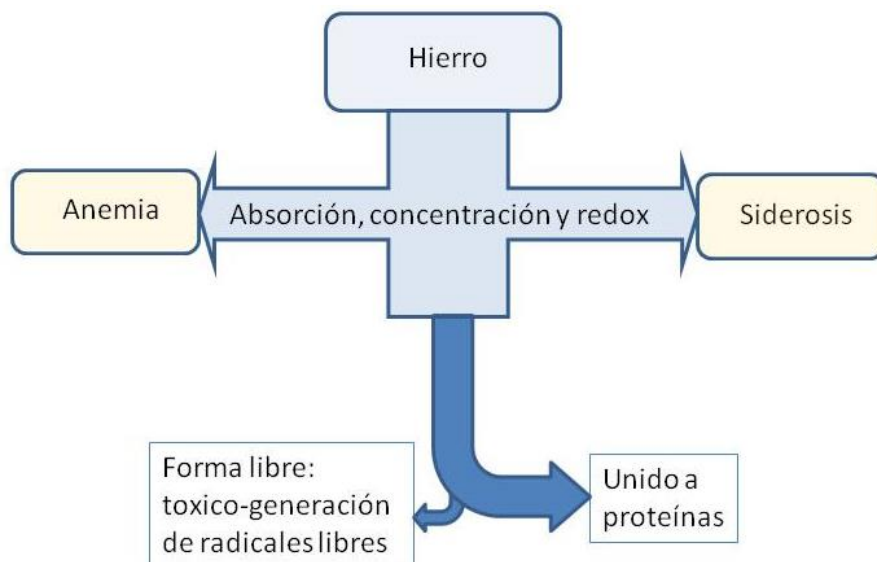


Figura 14.1. El metabolismo del hierro se encuentra fuertemente regulado con el fin de evitar problemas que pueden estar causados tanto por descenso como por aumento de hierro. Para evitar su toxicidad, este circula unido a proteínas.

Absorción

El hierro, luego de ser ingerido, puede ser absorbido a lo largo de todo el intestino, aunque con mayor eficacia a nivel del duodeno. El hierro ingerido puede ser clasificado en hierro hémico y en hierro no hémico (o también llamado inorgánico). El hierro hémico deriva predominantemente de la hemoglobina y mioglobina de la carne. Su absorción es altamente eficiente y esta menos influenciada por los constituyentes de la dieta luego de ser separado de la parte proteica (como por ejemplo, globinas) gracias a enzimas pancreáticas. Este Fe es absorbido por el enterocito gracias a un transportador y una vez dentro de la célula, es degradado mediante la enzima hemo oxigenasa y el hierro conjugado es liberado del macrociclo tetrapirrólico.

Contrariamente al hierro hémico, el hierro no hemo (principalmente hierro ferrico), se lo puede encontrar en carnes y vegetales. Es altamente insoluble y su disponibilidad se encuentra relacionada a varios componentes dietarios que influyen en forma positiva y negativa su absorción intestinal. Por ejemplo, el ácido gástrico y el ácido ascórbico promueven la reducción del hierro férrico favoreciendo su absorción. Por otro lado, factores que comunmente se encuentran en las dietas basadas en vegetales, tales como el fitato, el oxalato, los polifenoles y los taninos, disminuyen la absorción de hierro no hemo. Durante la absorción del hierro no hémico, se encuentran involucradas varias proteínas (Tabla 14.1).

Tabla 14.1

Nombre	Localización celular	Función
DMT1 (transportador de metales divalente 1)	Apical	Cotransportador Fe ²⁺ /H ⁺
DcytB (citocromo B duodenal)	Apical	Reducción de Fe ⁺³ a Fe ⁺² para absorción por DMT1
β3 Integrina / Mobilferrina	Apical	Captación Fe ⁺³ y absorción celular, respectivamente
Hemo oxigenasa	Intracelular	Inicio de apertura de anillo hemo y posterior liberación de Fe
Paraferritina	Intracelular	Reducción Fe ⁺³ a Fe ⁺²
Ferritina	Intracelular	Almacenamiento de Fe ⁺²
Ferroportina	Basolateral	Excreción de Fe ⁺²
Hefaestina	Basolateral	Oxidación de Fe ⁺² a Fe ⁺³
Receptor de transferrina	Basolateral	Unión de transferrina
Apo transferrina	Soluble en sangre	Transporte de Fe ⁺³

Proteínas involucradas en la absorción del hierro dietario.

El transportador de metales divalentes (DMT1) es un cotransportador que además de Fe²⁺, cotransporta un protón (Fig. 14.2). Otros cationes pueden ser cotranportados por este trasportador, tales como el Mn²⁺, Cd²⁺ y algunos investigadores proponen que Cu²⁺ podría ingresar a la célula. Este transportador es de suma importancia en la absorción de Fe al organismo. Se demostró que deleciones o mutaciones en el gen DMT1 producen una anemia severa por deficiencia de Fe, tanto en roedores como en humanos, sobre todo cuando la dieta es no-hemica.

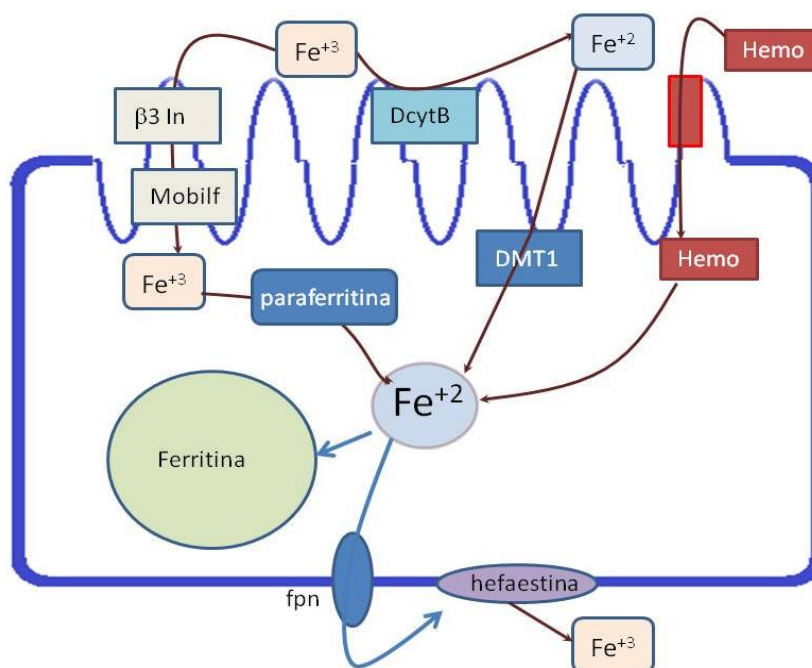


Figura 14.2. Esquema de un enterocito y sus mecanismos para absorber el Fe. β3 In: β3 Integrina; Mobilf: mobilferrina; fpn: ferroportina. (Imagen adaptada de Perez 2005)

La mayoría del hierro no hémico ingerido se encuentra en forma ferrica y este es incapaz de ser transportado por el DMT1, es por ello, que debe ser reducido a la forma ferrosa. Este proceso se lleva a cabo por acción de un citocromo llamado Citocromo b duodenal (DcytB). Este citocromo puede reducir al Fe^{+3} a Fe^{+2} gracias a un electron tomado del ácido ascórbico intracelular, lo que demuestra la importancia de la vitamina C en la absorción del hierro. Su expresión está aumentada en situaciones de hipoxia o de deficiencia de hierro dejando de manifiesto la necesidad de este citocromo para aumentar la absorción, sin embargo, se ha demostrado a partir de estudios usando ratones KO, que DcytB resulta no ser necesario para una eficiente absorción de hierro. Por otro lado, existe otro sistema de absorción de hierro que llevan a cabo la absorción del ion ferrico. La α 3 integrina, capta al Fe^{+3} y luego se lo cede a la mobilferrina, la cual lo internaliza en la célula. Dentro del enterocito, una enzima llamada paraferitina reduce el Fe^{+3} a Fe^{+2} . Una vez dentro de la célula, el Fe^{+2} puede ser unido a diferentes sustratos para evitar que se almacene en forma libre, por ejemplo se puede unir a aminoácidos, a proteínas o distintos ácidos orgánicos siendo el citrato la forma mayoritaria. El destino del hierro dentro del enterocito depende de dos situaciones. Si las demandas de hierro son bajas, este se almacena en forma de ferritina. Contrariamente, cuando hay alta demanda de hierro, este pasa rápidamente hacia la membrana basolateral donde es transportado gracias a la ferroportina. Una vez que el Fe^{+2} cruza la superficie basolateral del enterocito, es oxidado gracias a una enzima anclada en la membrana plasmática llamada hefaestina para que de esta forma el Fe^{+3} pueda ser tomado por la apoferritina y pueda ser transportado en sangre a los diferentes tejidos que lo necesiten.

Transporte en sangre. Transferrina

Una vez liberado a sangre, el Fe es transportado a las distintas células para su utilización. Para evitar los efectos tóxicos de hierro libre, mayoritariamente circula unido a una proteína llamada apotransferrina. Esta proteína es producida por el hígado y posee dos sitios de unión con alta afinidad a pH fisiológico para Fe^{+3} , requiriendo por cada hierro, un anión de carbonato o bicarbonato como reforzador de esta unión. Normalmente, la transferrina se encuentra saturada en un 30%, esto le da la capacidad de funcionar como un sistema buffer cuando existen grandes cantidades de hierro. Sin embargo, cuando se encuentra saturada, el hierro puede unirse a otras moléculas, tales como ligandos de bajo peso molecular o citrato formando un pool de Fe no unido a transferrina.

Fe intracelular. Receptor de transferrina y Ferritina

La entrada de los átomos de hierro a la célula, se hace mayormente a través de la unión de la transferrina al receptor de transferrina. Existen dos tipos de receptores de transferrina, tipo uno (RTf t1) y tipo 2 (RTf t2). En la tabla 2 se resumen sus diferencias.

Tabla 14.2

	RTf t1	RTf t2
Afinidad por la transferrina	Alta	Baja
Ubicación	Membrana plasmática	Membrana plasmática
Órganos	Ubicua	Hepatocitos y precursor eritroide
Ubicados en ollos tapizados de Clatrina	Si	No
Función	Unión a la transferrina y endocitosis	Unión a la transferrina y regular expresión de hepcidina
Expresión regulada por IRE	Si	No

Principales diferencias entre RTf 1 y RTf 2.

Los RTf t1 se encuentran en ollos tapizados de clatrina en la membrana plasmática de las células, unen a la transferrina. A pH fisiológico, el receptor posee una alta afinidad por la transferrina con dos átomos de hierro, mediana afinidad con un átomo de hierro y baja afinidad por apotrasferrina. Luego de la unión a la transferrina, los complejos receptor-ligando son endocitados y se fusionan con endosomas. Bajo condiciones acidas de estos organelos (pH 5,5), la transferrina pierde afinidad por el hierro, liberándolo al interior de endosoma. Luego de su liberación, gracias a una DMT1 en la superficie del endosoma, el Fe^{+2} es transportado al citoplasma, previa reducción del Fe^{+3} en el endosoma (Fig. 14.3). Una vez realizado este proceso, el complejo RTf t1-apoferritina es transportado a la superficie de la célula donde, debido al pH neutro, se disocian y la transferrina vuelve a circulación.

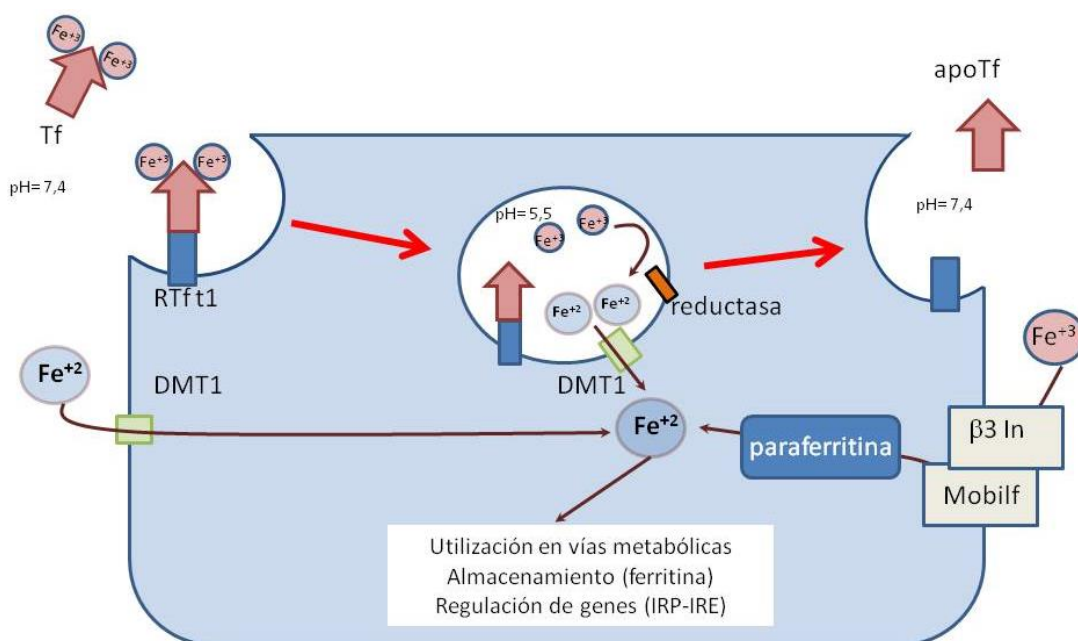


Figura 14.3. Distintas formas de ingresar el Fe a una célula típica y sus posibles destinos intracelulares. RTf t1: receptor de transferrina tipo 1. (Imagen adaptada de Perez 2005)

Otra forma que poseen las células de tomar el hierro es mediante los mecanismos que se han descrito en la figura 14.2, aunque estos procesos ocurren en mucha menor proporción que el mecanismo mediado por el complejo Transferrina-RTf tipo 1.

Una vez dentro de la célula, el hierro puede cumplir tres funciones básicas:

- 1.-Ser utilizado: es decir formar parte de las enzimas que necesitan hierro para su función (por ejemplo, proteínas hémicas, proteínas con clústeres de Fe-S, etc)
- 2.- formar parte de los depósitos: es decir, ser depositados dentro de la ferritina
- 3.- formar parte de la regulación de la expresión de ciertas proteínas (IRP-IRE)

Las células pueden almacenar el Fe bajo dos formas: como ferritina y como hemosiderina. La primera, la ferritina, es la forma de almacenamiento predominante, contiene fracciones de hierro soluble y móvil; en cambio, la hemosiderina es un depósito que resulta de agregados de la descomposición de la ferritina en los lisosomas secundarios y su nivel aumenta según aumenten los niveles de sobrecarga de hierro. La apoferritina resulta en una cubierta de 24 subunidades de dos tipos. La subunidad ligera L (PM 19.000 g/mol) y la subunidad pesada (PM 21.000 g/mol). Ambas, además de formar la cubierta de la ferritina, poseen funciones específicas. La subunidad H tiene actividad de ferroxidasa (transforma Fe^{+2} a Fe^{+3}) mientras que la subunidad L, facilita la nucleación del hierro a partir de complejos de fosfato ferrico. En su interior, la ferritina puede albergar hasta 4500 átomos de Fe^{+3} . Al igual que el receptor de transferrina tipo 1, las expresiones de las subunidades de la apoferritina L y H están regulados mediante elementos IRE-IRP.

Regulaciones mediadas por Elementos que responden al hierro (IRE) – Proteínas que se unen a los Elementos que responden al hierro (IRP)

Con el fin de obtener la concentración necesaria de Fe para que se lleven a cabo todas las reacciones bioquímicas que lo requieran, pero no tan elevada como para que ocurra un daño tóxico, la expresión del receptor de transferrina tipo 1 y la ferritina (además de otras proteínas) están reguladas por la unión o no unión de IRP a IRE. Los IRE (del inglés *Iron-responsive elements*) constituyen *loops* altamente conservados ubicados en las regiones no traducidas de varios ARNm. Estos pueden estar localizados en el extremo 5' o 3' del gen, pero nunca en ambas zonas. Si se ubican en el extremo 5', el ARNm posee un solo IRE, mientras que cuando están ubicados en el extremo 3', el ARNm posee 5 secuencias de IRE. A estos IRE, se unen los IRP (del inglés *iron-responsive element-binding proteins*). Al momento se han descrito dos IRP, el IRP1 y el IRP2. Si bien ambos funcionan como sensores de los niveles de hierro, IRP2 posee mecanismos de acción distintos al IRP1 y además es menos abundante. Otro punto en común que poseen ambos IRPs es que se unen a los IRE solo cuando hay baja concentración de hierro dentro de las células. Cuando los IRPs se unen a los IRE que se encuentran en la región 5' del ARNm, no permite que las subunidades de los ribosomas se unan y se genere la proteína. En cambio, cuando se unen a los IREs que se encuentran en la región 3' se estabiliza el ARNm impidiendo su degradación y permitiendo su traducción.

IRP1 poseen en su interior un cluster de 4Fe-4S, con esta conformación, este IRP posee actividad de aconitasa. Cuando los niveles de Fe disminuyen, este cluster cambia a una composición de 3Fe-4S, lo cual le permite unirse a los IREs (Fig. 14.4). A diferencia de IRP1, IRP2 carece del cluster formado de Fe-S y tampoco posee actividad de aconitasa. En su extremo N terminal, contiene una secuencia rica en residuos de cisteína, de esta forma, cuando los niveles de Fe son elevados, esta secuencia hace que la proteína pueda ser degradada por proteosoma.

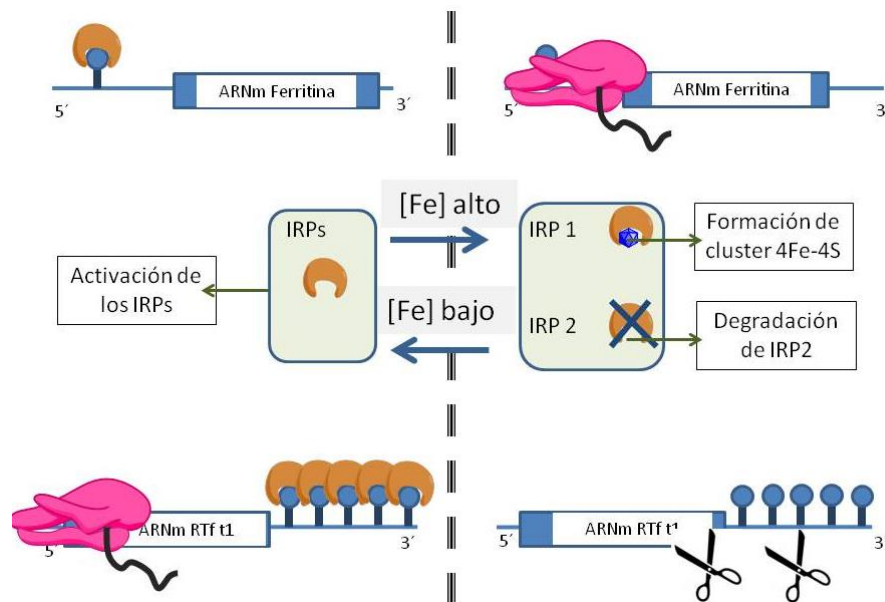


Figura 14.4. Mecanismo de regulación de expresión de genes mediante IRP-IRE.

A través de estos mecanismos se garantiza que se expresen aquellas proteínas que se necesitan cuando el hierro está en baja o en alta concentración. Por ejemplo (Fig.14.4), la traducción de los ARNm del RTf tipo 1 y de ferritina se encuentran regulados por este mecanismo. Los IRE de estos genes se encuentran en la región 3' y 5' de sus respectivos ARNm. Cuando los niveles de Fe disminuyen, los IRPs poseen afinidad por los IRE estabilizando el ARNm del RTf tipo 1 e impidiendo su degradación e inhibiendo que se sinteticen ambas subunidades de la ferritina, así, bajo estas condiciones, se expresa mayor cantidad del RTf tipo1 para aumentar los niveles de hierro intracelular y disminuye la expresión de ferritina y por tanto, el poco hierro intracelular que haya estará disponible y no almacenado. Cuando se logra este cometido (es decir, altos niveles de hierro) los IRPs se liberan de los IREs y de esta forma el ARNm del receptor puede degradarse disminuyendo la entrada de hierro a la célula. Al mismo tiempo las subunidades de ferritina pueden sintetizarse para poder almacenar el exceso de hierro dentro de las células. La lista de genes que se regulan por este sistema es larga, otros genes que se regulan por este mecanismo son Ala sintetasa eritroide, ferroportina, aconitasa, etc.

Distribución y Balance

La distribución de hierro en el organismo es cerrada y eficiente. De los 3-4 g de hierro que hay en todo el cuerpo, se lo puede dividir en tres compartimientos (Fig. 14.5). Un compartimiento

de depósito, intracelular, que es no solo para almacenar el hierro, sino para evitar que el Fe no se encuentre libre y ejerza efectos tóxicos. Un compartimiento funcional, que representa el componente mayor de Fe, y el menor de los tres compartimientos es el de Fe en circulación, el cual posee menos de 1% del Fe total.

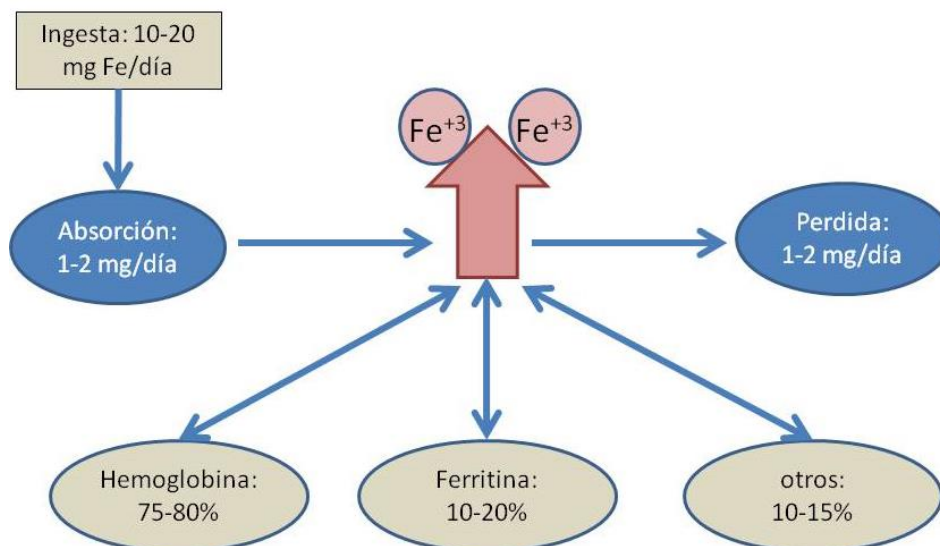


Figura 14.5. Absorción, distribución y eliminación de Fe en el organismo

Generalmente, una comida suele aportar entre 10 y 20 mg de Fe, de los cuales, solo el 10% (1-2 mg) es absorbido por el enterocito. Luego de ser absorbido, el Fe pasa a circulación para ser tomado por la transferrina y llevado por sangre a los órganos que lo necesitan. Diariamente, a su vez, se pierden 1-2 mg de Fe, mediante diversos procesos, tales como la descamación del epitelio, menstruación, etc. Es decir, se pierde por día una cantidad equivalente a lo que se absorbe y no existe un mecanismo fisiológico exclusivo para eliminar el exceso de hierro. Del total del hierro en el organismo, la médula ósea consume la mayor parte, cerca del 75 % del total, con el fin de producir la hemoglobina de los glóbulos rojos.

El 10 al 20% del Fe se encuentran en depósitos y alrededor del 10% está implicado en otros procesos como la producción de mioglobina, citocromos, etc.

La médula ósea consume alrededor de 20 mg de Fe por día, es decir de 10 a 20 veces más de lo que se absorbe. Para cubrir estas necesidades, el Fe debe ser reciclado a partir de la degradación de las proteínas que contienen Fe, donde diariamente, 20 mg de Fe es liberado por el sistema retículo endotelial luego de la degradación de los glóbulos rojos envejecidos (Fig. 14.6). Gracias a este reciclaje, la médula ósea puede llevar a cabo la producción de glóbulos rojos necesarios para reponer a los glóbulos rojos envejecidos. El resto del hierro, es almacenado en el hígado el cual lo liberara según la demanda del organismo.

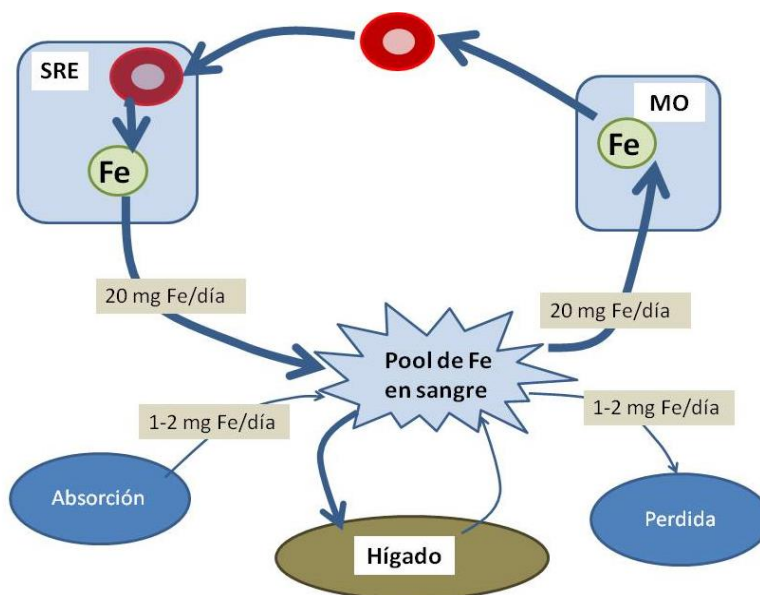


Figura 14.6. Esquema donde se muestra la importancia del reciclado del Fe. SRE: Sistema Retículo-Endotelial. MO: Medula Ósea. (Imagen adaptada de Pietrangelo 2004)

Hepcidina

La hepcidina es un péptido de 25 aminoácidos que se descubrió en el año 2000, encontrándolo tanto en orina como en plasma. Es sintetizado por los hepatocitos y en un principio se observó que tenía actividad antimicrobiana. Su síntesis se ve estimulada ante procesos inflamatorios y por sobrecarga de hierro, siendo su rol, inhibidor de la captación intestinal del Fe, de la liberación del Fe desde los macrófagos y del transporte de Fe a través de la placenta, por lo que rápidamente se la consideró como la hormona que regula los niveles de Fe en el organismo. Este efecto se logra a través de la unión de Hecpidina a la ferroportina, haciendo que esta sea endocitada y degradada. De esta forma, frente a altos niveles de Fe, la hepcidina inhibe la liberación de Fe a sangre desde los enterocitos y los macrófagos (Fig. 14.7).

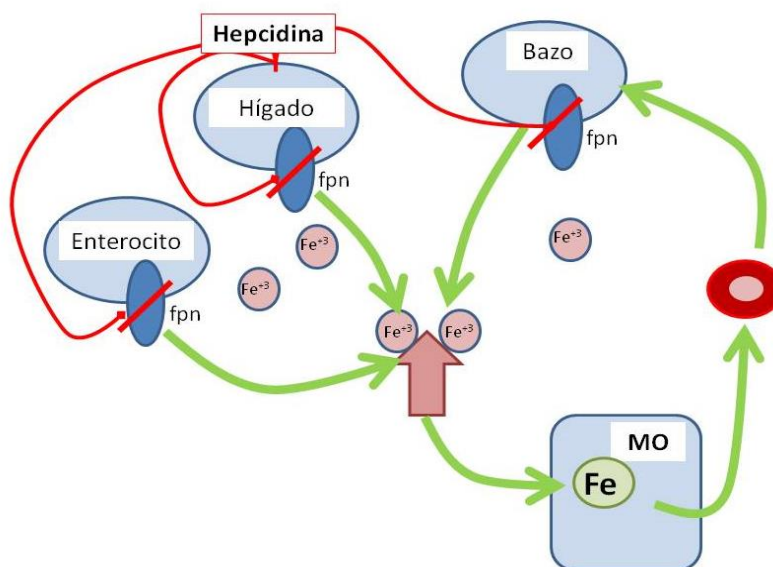


Figura 14.7. Efecto de la hepcidina sobre diversos tejidos

En cuanto a la regulación de la síntesis de la hepcidina, su expresión se encuentra regulada a nivel transcripcional a través de varias vías, que dependen de ciertas circunstancias o situaciones (Fig. 14.8).

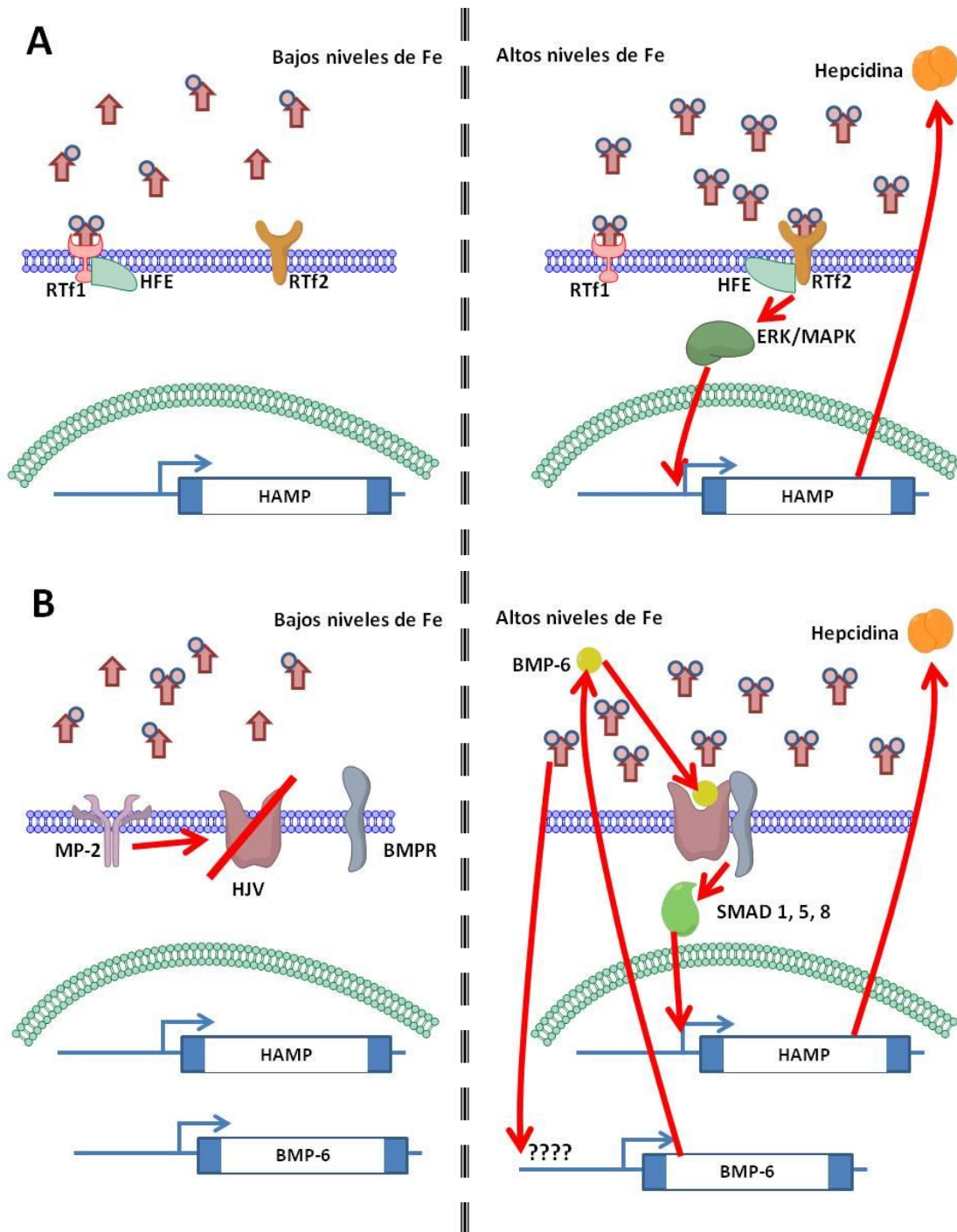


Figura 14.8. Aumento de la expresión de hepcidina cuando hay aumento de Fe en sangre. A. Via receptor de transferrina tipo 2 y HFE. B. Via hemojuvelina y Receptor de BMPs. (Imagen adaptada de Darshan 2009)

Cuando hay baja concentración de transferrina di férrica, la proteína de membrana HFE (del inglés *High Fe*) se encuentra unida al RTf t1. En situaciones de alta concentración de transferrina

di férrica, esta se une tanto a RTf t1 como al RTf t2. La unión de la transferrina a RTf t2, causa una disociación entre RTf t1 y HFE, haciendo que este último se una a RTf t2. El aumento del RTf t2 estabilizado por su unión a HFE produce un aumento de la expresión de la Hepsidina via ERK/MAPK (Fig 14.8A).

En condiciones de bajo contenido de Fe en el hígado, la expresión de hepcidina es baja. En estas circunstancias se regula en forma positiva de la expresión de la proteasa de membrana plasmática llamada matriptase-2 (MP-2). Esta proteasa corta e inactiva el correceptor de BMP (del inglés *Bone morphogenic protein*), llamado Hemojuvelina (HJV) lo que conlleva a una inhibición de la señalización de BMP y no produce aumento de la expresión de hepcidina. Cuando los niveles de Fe son elevados, aumenta los niveles de producción y secreción de BMP6, el cual se une a su receptor estabilizado por la unión de HJV. Este complejo fosforila una serie de proteínas SMAD (de su sigla en ingles *small mothers of decapentaplegic*) que conduce a la regulación positiva de la expresión de hepcidina (Fig 14.8B).

El mecanismo mejor estudiado es el que ocurre a través del mediador proinflamatorio IL-6. En caso de una infección, los niveles de IL-6 aumentan uniéndose a su receptor. Esta unión inicia la activación de la vía JAK-STAT3 el cual se une directamente al promotor para aumentar la expresión de hepcidina. De esta forma, cuando existe una bacteriemia, aumenta la expresión de hepcidina, a fin de disminuyan los niveles sanguíneos de Fe, los cuales son necesarios para que las bacterias lleven a cabo distintas reacciones bioquímicas (Fig 14.9).

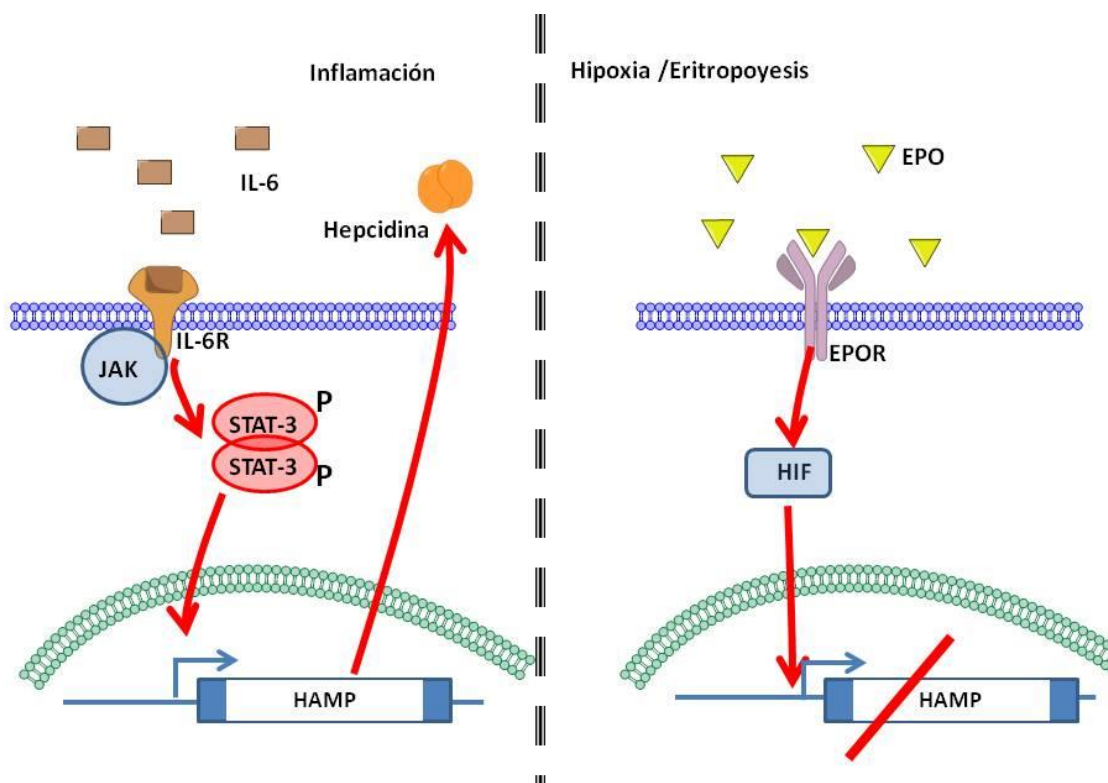


Figura 14.9. Regulación de la expresión de hepcidina en estado inflamatorio o en estado de hipoxia. (Imagen adaptada de Darshan 2009)

Otro mecanismo de regulación de la hepcidina es a partir de la disminución de O₂. El estado de hipoxia y la eritropoyesis son inhibidores de la expresión de hepcidina, esto se debe a que en estos dos estados es necesaria una continua y constante disponibilidad de Fe. Sin embargo, estas son las vías menos conocidas por las cuales se regula la expresión de hepcidina. Se ha demostrado que en estas condiciones, el aumento de la eritropoyetina, al unirse a su receptor, promueve la unión de HIF (de su sigla en inglés *Hypoxia-inducible factor*) al promotor y así reprime la expresión de hepcidina (Fig 14.9).

Como puede verse, no solamente la sobrecarga o disminución del Fe llevan a regular la expresión de la hepcidina. En estados de bajo Fe o bajo O₂, los niveles de hepcidina se encuentran disminuidos y por lo tanto habrá absorción de Fe por parte de los enterocitos y excreción de Fe por parte de los hepatocitos y de los macrófagos. En cambio, cuando hay aumento de los niveles de Fe o un estado inflamatorio, los niveles de hepcidina aumentan favoreciendo la internalización de la ferroportina y de esta forma disminuye la liberación de Fe a sangre.

Hemocromatosis Hereditaria

La Hemocromatosis Hereditaria (HH) es un desorden del metabolismo del hierro que resulta de la alteración en los mecanismos que regulan la absorción de Fe, llevando a un aumento progresivo del Fe y daño orgánico. Es de carácter hereditario, con una incidencia de 1 en 200. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año 1865 por Armand Trousseau llamándola Diabetes bronceada debido a que los pacientes presentaban falla pancreática produciendo Diabetes mellitus e hiperpigmentación en la piel, además de afectar al hígado, el corazón y otras glándulas endocrinas. A mediados de 1990, se identificó al gen de HFE como causante de esta enfermedad, hoy en día, se sabe que mutaciones en otros genes pueden desencadenar esta patología. No obstante, sin importar el gen que se encuentra mutado, todas estas alteraciones conllevan en un defecto en la regulación de la hepcidina-ferroportina (Fig 14.10).

Dependiendo de qué genes se encuentre alterado, la HH se clasifica como tipo 1 (gen mutado: HFE); tipo 2A (gen mutado: HJV); tipo 2B (gen mutado: HAMP); tipo 3 (gen mutado: TRF2) y tipo 4 (gen mutado: SLC40A1, de ferroportina), donde la más frecuente, son las mutaciones que afecta a HFE.

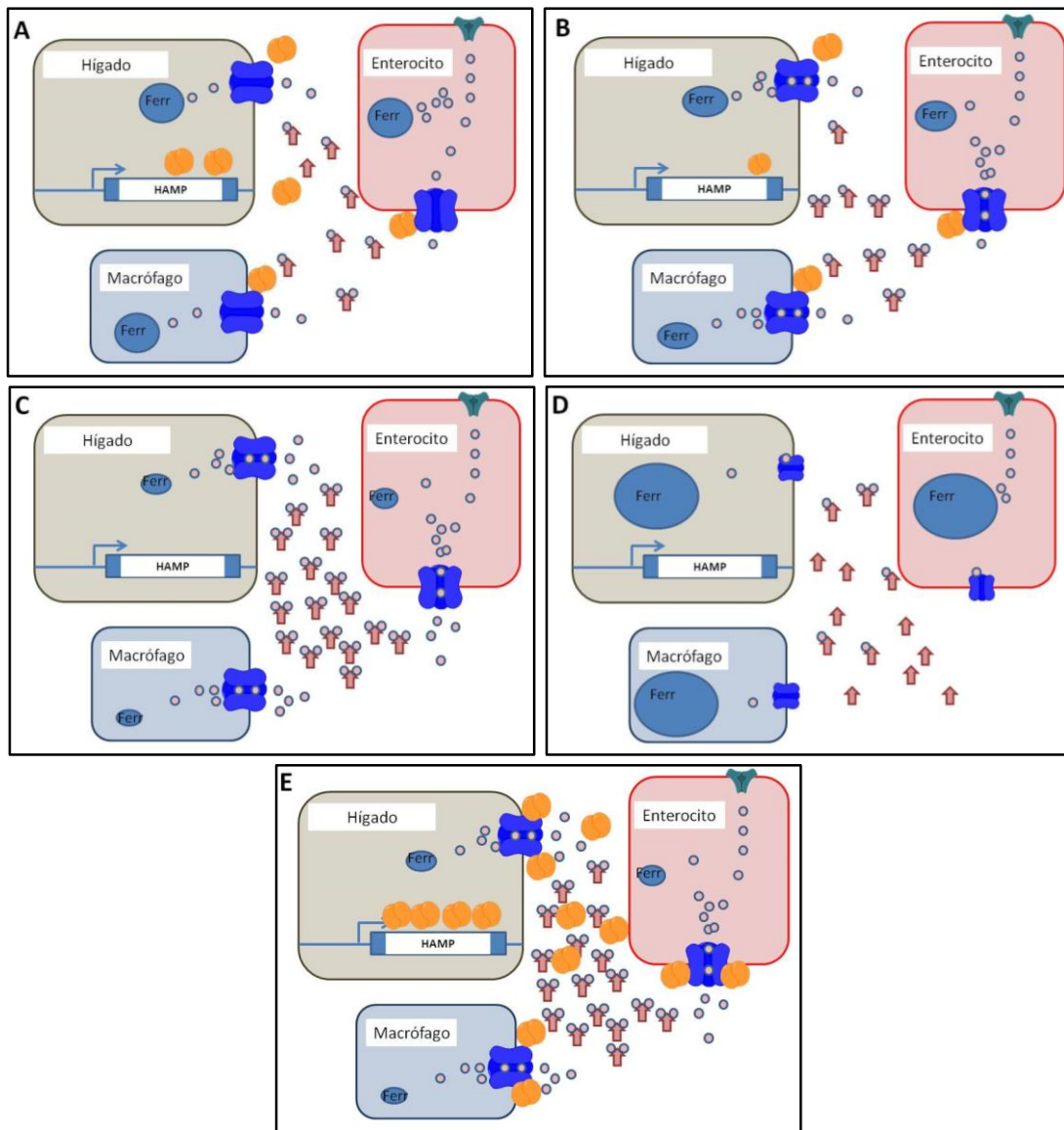


Figura 14.10. A.- estado normal, donde una expresión basal de hepcidina, mantiene los niveles dentro del rango normal de Fe en sangre. B.-disminución de los niveles de hepcidina como podría ocurrir en las mutaciones de HFE y RTf2. C.-gran disminución de los niveles de hepcidina, podría ser en las mutaciones de HAMP y HJV. D.- Actividad disminuida del transportador de ferroportina. E.-resistencia de la ferroportina a los efectos de la hepcidina. Ferr: Ferritina. (Imagen adaptada de Pietrangelo 2006)

Hemocromatosis Hereditaria tipo 1

El gen implicado en esta forma de HH se llama HFE, siendo el tipo de herencia autosómico recesivo. HFE es una proteína ubicada en la membrana plasmática que pertenece a la familia de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase 1. Las dos mutaciones más frecuentes son C282Y (G845A) y H63D (C187G). De ambas mutaciones, la primera resulta en la mutación más prevalente de la población occidental con alta incidencia en europeos del norte con antepasados celtas o vikingos. Se cree que esta mutación ofrecía a estas poblaciones un efecto protector debido a su dieta baja en hierro. Esta frecuencia desciende desde el NO al SO de Europa.

Mutación en este gen desencadena una absorción aumentada de Fe en el intestino debido a una disminución en la expresión de la hepcidina, resultando en un aumento de los depósitos de hierro en forma silenciosa y asintomática durante años. El inicio de los síntomas ocurre entre la 4ta y 5ta década, siendo el aumento de la saturación de la transferrina la primera anomalía bioquímica detectable. El tratamiento a través de una flebotomía es eficiente, resultando en una disminución rápida de los niveles de hierro en sangre, sin producir riesgo de anemia.

Hemocromatosis Hereditaria tipo 2A

El gen implicado en este tipo de HH es el HJV (antes denominado HFE2), asociado con una herencia autosómica recesiva. Este gen codifica para una proteína llamada hemojuvelina cuya función es actuar junto al receptor de BMP para poder llevar adelante la expresión de la hepcidina. Mutaciones en este gen causan daños en múltiples órganos, tales como el corazón, hígado, páncreas incluso puede causar hipogonadismo. A diferencia del anterior, en este tipo de HH disminuye fuertemente la expresión de hepcidina, lo cual presenta una clínica más severa a edades más tempranas (generalmente antes de 30 años). La saturación de la transferrina es la anomalía bioquímica que se detecta más tempranamente, siendo la flebotomía el tratamiento por elección para disminuir los niveles de saturación de transferrina sin riesgo de anemia.

Hemocromatosis Hereditaria tipo 2B

En este caso, el gen afectado es el HAMP y al igual que los anteriores se transmite en forma autosómica recesiva. Este gen codifica para la expresión de la hepcidina y por lo tanto, mutaciones en este gen producirán una gran absorción de Fe en el enterocito por falta de hepcidina. Los principales órganos donde se acumula el Fe son el hígado, el corazón y las glándulas endocrinas produciendo un daño orgánico elevado. Al igual que en el caso anterior, la aparición de los síntomas ocurre antes de los 30 años, siendo los elevados niveles de transferrina saturada la primera manifestación. Nuevamente, el tratamiento de elección es la flebotomía sin producir riesgo de anemia.

Hemocromatosis Hereditaria tipo 3

La HH tipo 3, tiene un fenotipo similar a la tipo 1, pero de incidencia rara. El gen implicado es el RTf2 que codifica para el receptor de transferrina tipo 2, el cual posee una afinidad por la transferrina saturada 25 veces menor que el RTf t1. Al igual que todos los casos anteriores, la anomalía clínica detectable más tempranamente es el aumento de la saturación de la transfe-

rina, la flebotomía ayuda a disminuir la concentración de Fe también en esta situación. Los principales órganos afectados resultan ser el hígado, glándulas endocrinas, corazón y el inicio de la clínica ocurre entre la cuarta y quinta década de vida.

Hemocromatosis Hereditaria tipo 4

También llamada enfermedad de la ferroportina, este tipo de HH genera características clínicas, histológicas y bioquímicas distintas a las anteriores HH. El gen implicado en esta clase es el gen SLC40A1, el cual produce una enfermedad con herencia autosómica dominante y codifica para la ferroportina. Existe dos subclases de este tipo de HH: Tipo 4A.- las mutaciones en este gen lleva a una pérdida de función debido a una disminución de la expresión de la ferroportina en la superficie celular, lo que causa retención de hierro dentro de las células, en especial, los macrófagos y por lo tanto una consecuente restricción de hierro para la eritropoyesis. La de tipo 4B.- corresponde a mutaciones que hacen que la ferroportina sea refractaria a la acción de la hepcidina y por lo tanto, independientemente de los niveles de esta hormona, la ferroportina no se internaliza y se exagera la absorción de Fe. Por lo tanto, dependiendo del tipo de mutación en el gen, los pacientes pueden presentar diferencias en el fenotipo y expresión clínica. En cuanto al tratamiento, la flebotomía puede causar riesgo de anemia en tipo 4A debido a que los niveles de Fe en sangre suelen estar disminuidos, sin embargo, se puede notar que los niveles de ferritina en sangre permanecen altos. El inicio de la clínica suele ser entre la quinta y sexta década de vida.

Expresión Clínica de Hemocromatosis Hereditaria

No todas las HH presentan la misma expresión fenotípica (Fig 14.11). Por ejemplo, mutación en HFE se asocia con HH t1, la cual se expresa clínicamente en la edad adulta y con una menor severidad clínica. Por otro lado, la HH t2 (A o B) se manifiesta a edades más tempranas y con una sintomatología más grave.

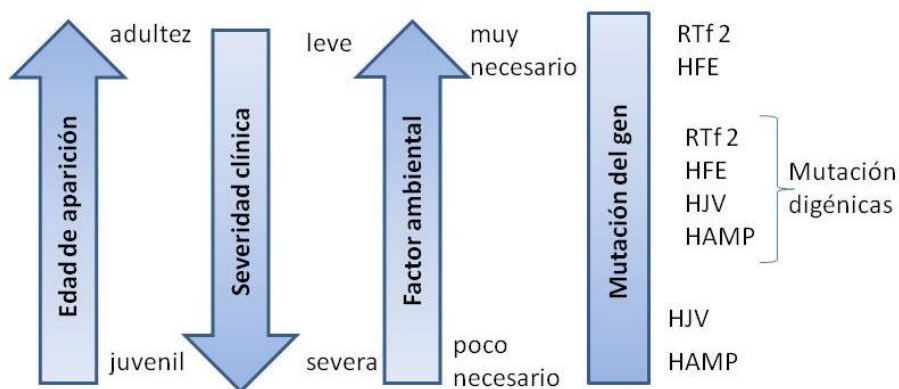


Figura 14.11. Edad de aparición de los síntomas, severidad de la clínica y la necesidad de factores ambientales en función de las mutaciones monogénicas o digénicas de las distintas HH.

Si bien, según el gen que se encuentra mutado producirá un fenotipo clásico, es importante destacar que las manifestaciones clínicas que pueden describirse, al igual que el rango de aparición de la enfermedad, resultan en un espectro continuo debido a que una misma persona puede presentar mutaciones en varios genes, de tal manera que su cuadro clínico puede ser algo intermedio.

Las manifestaciones clínicas reflejan el daño producido por acumulación de Fe en los tejidos y se expresan cuando los niveles de Fe acumulados alcanzan los 20-40 g, es decir, unas 10 veces más de lo normal.

La descripción clásica de la clínica incluye la triada de Diabetes mellitus, hiperpigmentación cutánea y hepatomegalia. Sin embargo, la combinación de síntomas al inicio de las manifestaciones clínicas son inespecíficos, tales como fatiga inexplicable, dolor abdominal o dolor articular, enfermedad hepática (desde ligera elevación de aminotransferasas con o sin hepatomegalia, cirrosis y carcinoma hepatocelular), enfermedades endócrinas (diabetes, hipogonadismo hipogonadotrópico, impotencia, e hipotiroidismo), enfermedad cardiovascular (arritmias e insuficiencia cardíaca) y enfermedad articular (artritis degenerativa).

Diagnóstico

El diagnóstico debe considerarse en cualquier paciente con hepatomegalia inexplicable, hiperpigmentación, cardiomiopatía, artritis, DM y/o impotencia. En el laboratorio de análisis clínico se pueden medir:

- ✓ Hierro (Fe): método inmunturbidimétrico. Valor de referencia en hombres: 59-158 ug/dl; en mujeres: 37-145 ug/dl
- ✓ Transferrina: método inmunturbidimétrico. Valor de referencia: 200-360 mg/dl
- ✓ Ferritina sérica: método inmunturbidimétrico. Valor de referencia en hombres:30-400 ng/ml y en mujeres: 15-150 ng/ml.
- ✓ Índice de saturación de transferrina (IST): Valor de referencia; Valor de referenci: 20-50%.

En ausencia de causas secundarias de exceso de Fe, como ingesta excesiva de alcohol, anemias hemolíticas, transfusiones sanguíneas o en síndrome metabólico; estos parámetros de laboratorio elevados sugieren HH.

Se pueden realizar test genético para confirmar las mutaciones, los cuales no son invasivos como las biopsias hepáticas. A pesar que los test genéticos ayudan a realizar el consejo genético, resulta importante saber que las mutaciones denotan solamente susceptibilidad a la enfermedad, debido a que se necesitan factores ambientales para que se manifieste la HH.

Tratamientos

Existen varias estrategias con potencial aplicación clínica, que se encuentran en estudio:

- ✓ Análogos de hepcidina: Aunque el tratamiento de elección actual para HH continúa siendo la flebotomía, los análogos de hepcidina podrían llegar a ser tratamientos de talasemias y otras anemias hereditarias que se acompañan de sobrecarga de Fe, casos en los que la flebotomía no es un tratamiento de elección.
- ✓ Antagonistas de hepcidina: los antagonistas de hepcidina podrán ser utilizado como tratamiento de anemias causadas por inflamación.
- ✓ Dosaje de Hepcidina en sangre o en orina: Puede ser útil para realizar el diagnostico diferencial entre Anemia infecciosa (donde hay aumento de los niveles de hepcidina) de anemia por deficiencia de Fe (donde hay una disminución de los niveles de hepcidina). Además, se podría realizar el diagnostico diferencial en HH tipo 1 y 3 (en las cuales hay una deficiencia de hepcidina) de la HH tipo 4A donde los niveles de de hepcidina están disminuidos.

Referencias

- Anderson E, Shah YM. Iron homeostasis in the liver. *Compr Physiol*. 2013 (3) 315.
- Darshan D, Anderson GJ. Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biometals* 2009 (22) 77.
- Fleming R, Bacon BR. Orchestration of Iron Homeostasis. *N Engl J Med*. 2005 (352) 1741.
- Gulec S, Anderson GJ, Collins JF. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014 (307) G397.
- Lawen A, Lane DJR. Mammalian Iron Homeostasis in Health and Disease: Uptake, Storage, Transport, and Molecular Mechanisms of Action. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013 (18) 2473.
- Limdi J, Crampton JR. Hereditary Haemochromatosis. *Q J Med*. 2004 (97) 315.
- Perez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G, Nesse A. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005 (39) 301.
- Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis — A New Look at an Old Disease. *N Engl J Med* 2004 (350) 2383.
- Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006 (1763) 700.
- Rossi E. Hepcidin - the Iron Regulatory Hormone. *Clin Biochem Rev*. 2005 (26) 47.
- Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015 (1852) 1347.

CAPÍTULO 15

Metabolismo del Hemo - Porfirias

Sara R. Chuguransky y Juan Manuel Fernández

Introducción

El hemo es un anillo tetrapirrólico perteneciente al grupo de las metaloporfirinas y constituyente de muchas proteínas celulares que realizan funciones de transporte y almacenamiento de oxígeno (hemoglobina, mioglobina), de aquellas que transportan electrones (Citocromos de las cadenas respiratorias de la mitocondria) y de proteínas que participan en reacciones del tipo oxidación-reducción (por ejemplo citocromo P450). El hígado y la médula ósea son los principales órganos donde se sintetiza el hemo, principalmente para la síntesis de citocromo p450 y hemoglobina, respectivamente. Sin embargo, también se sintetiza en casi todas las células debido a que el grupo hemo es importante para otras proteínas como ser catalasa, peroxidasa, triptofano pirrolasa, prostaglandina endoperóxido sintasa y guanilato ciclasa. En otros organismos, otra metaloporfirina de gran importancia es la clorofila, la cual, en lugar de quelar un átomo de Fe se encuentra quelando un átomo de Mg. De hecho, en 1930, Hans Fischer, describió a las porfirinas como un compuesto que hace verde a las hierbas y roja a la sangre.

Las porfirinas son tetrapirroles macrociclos de 4 anillos pirrólicos, unidos a su vez por cuatro puentes metenos (Fig 15.1). Además de ser compuestos cíclicos, poseen una cantidad de dobles enlaces conjugados que le otorgan estabilidad y características fotofísicas particulares.

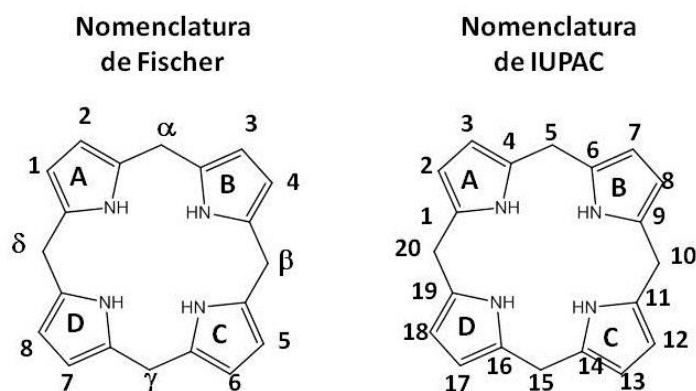


Figura 15.1. Formas de nombrar un mismo porfirinógeno según Fischer e IUPAC.
(Imagen adaptada de Scriver 2001)

Si bien, IUPAC (en inglés *International Union of Pure and Applied Chemistry*) ha tratado de otorgarle a estos grupos de compuestos una forma sistemática de nombrarlos, la forma más común de hacerlo es utilizando la forma de Fischer. En este último sistema se nombra a los ciclos pirrólicos con letras, a los carbonos donde se encuentran los sustituyentes con números y los puentes metenos con letras griegas. Los nombres que recibirán las porfirinas dependerán de los sustituyentes que las conforman. Por ejemplo, las etioporfirinas son una familia de compuestos de 4 miembros en donde luego de la descarboxilación oxidativa de sus 8 sustituyentes se obtienen grupos metilos y etilos como sustituyentes. En la Fig. 15.2 se observan los cuatro isómeros de esta serie de compuestos, en los cuales la molécula posee 8 sustituyentes de dos clases, 4 Ac. Acéticos y 4 Ac. propiónicos y se llaman uroporfirinógenos. Dependiendo de la secuencia de los grupos propiónicos y acéticos, se obtendrán los isómeros I, II, III y IV. Es importante destacar que de estos 4 isómeros, solo el uroporfirinógeno III llegará a producir el hemo.

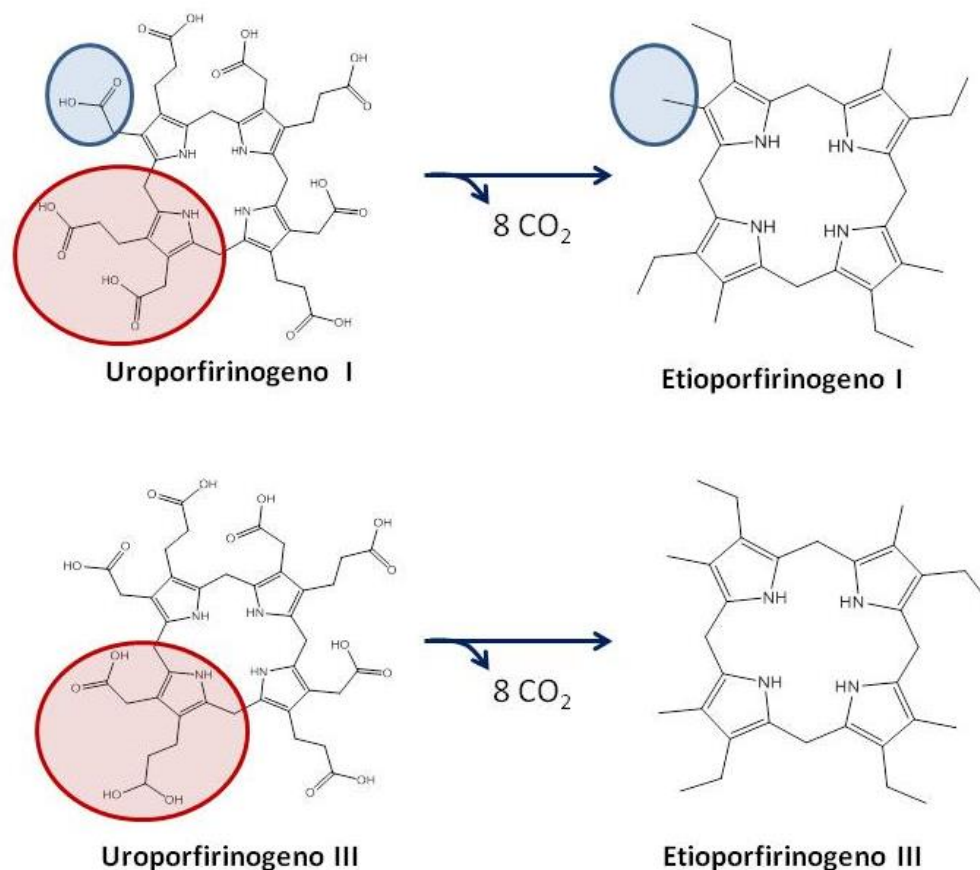


Figura 15.2. Descarboxilación oxidativa de los 8 grupos sustituyentes para formar las etioporfirinas. En azul se muestra un ejemplo de la obtención de un metilo a partir de la descarboxilación de un acético. En rojo, la diferencia entre el isómero I y el isómero III.

Otro grupo de isómeros son las mesoporfirinas, estas resultan de una descarboxilación oxidativa, pero no en todos los sustituyentes. Si dos de los anillos pirrólicos del tetrapirrol tienen como sustituyentes un metilo y un etilo y los otros dos tienen como sustituyentes un metilo y un propiónico, se obtienen 15 isómeros que constituyen la serie de las Mesoporfirinas.

Las porfirinas naturales sólo permiten obtener el isómero IX (Fig 15.3) de esta serie y proviene de la serie III de las Etioporfirinas.

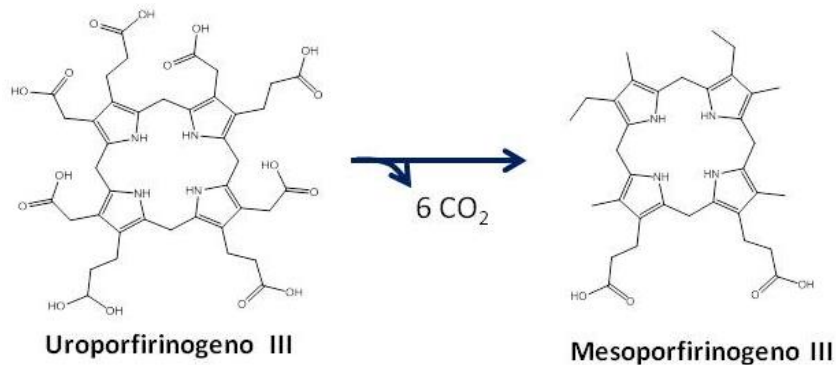


Figura 15.3. Descarboxilación oxidativa parcial que produce el mesoporfirinógeno IX.

Los grupos sustituyentes no solo le dan el nombre a las porfirinas y a los porfirinógenos, también le otorgan a estos compuestos la capacidad de ser hidrofobicos o hidrosolubles, dependiendo de cada uno de ellos. Por ejemplo, el uroporfirinógeno posee ocho grupos carboxílicos que le dan la capacidad de ser hidrosolubles, estando en el otro extremo las protoporfirinas, las cuales poseen solo dos grupos carboxílicos, compuesto con características hidrofóbicas. Dependiendo de su solubilidad en agua o no, se las podrá encontrar en heces o en orina (Fig 15.4). A lo largo de la ruta de síntesis del grupo hemo, se generan distintos intermediarios con diferentes número de grupos carboxílicos, que van de desde 8 (en el caso de uroporfirinógeno) hasta 2 (en el caso de la protoporfirina), así, estos intermediarios podrán ser encontrados y dosados tanto en muestras de orina como de heces.

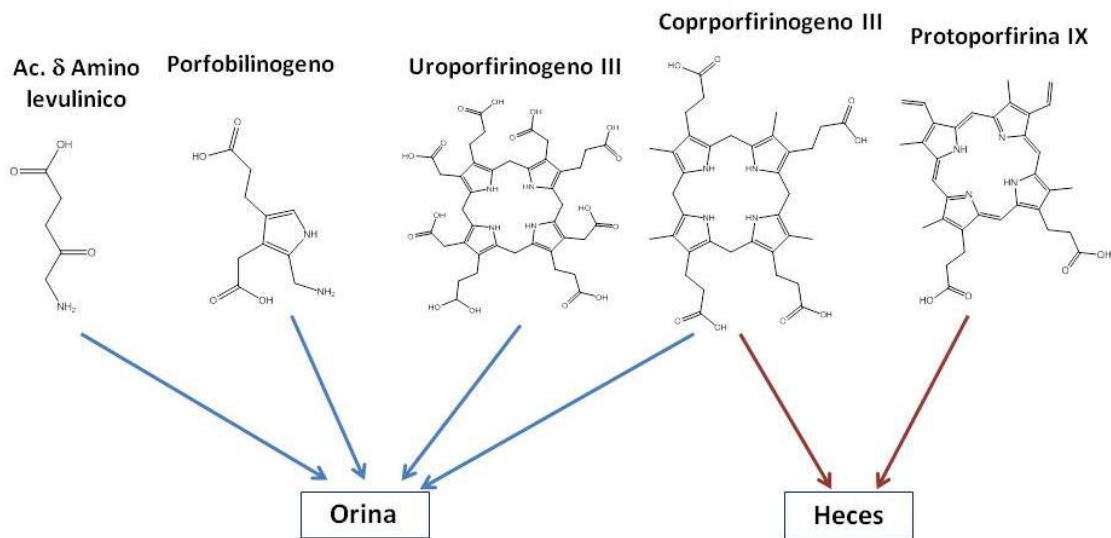


Figura 15.4. Aparición de intermediarios en heces u orina según su polaridad.

Además de la diferencias de los grupos sustituyentes, existen diferencias en el estado de oxidación del anillo tetrapirrólico. En la ruta de síntesis, los puentes metenos se encuentran en estado reducido, siendo estos llamados porfirinógenos, mientras que al final de la síntesis, se encuentran oxidados siendo estos las porfirinas. Según su estado oxidativo, estos compuestos poseen diferencias físicas y químicas entre ellos. Por ejemplo, los porfirinógenos son compuestos inestables químicamente e incoloros, con resonancia de los doble enlaces solo dentro de cada uno de los anillos pirrólicos. Por otro lado las porfirinas, al poseer doble enlaces conjugados a lo largo de todo el macrociclo, son químicamente más estables, poseen color y además emiten fluorescencia roja en el UV, más específicamente, cuando se las irradia a 400nm, la banda de Soret. En soluciones ácidas, presentan dos bandas de emisión fuerte, una a 600-610 nm y la otra a 640-660 nm. Todas las porfirinas presentan un espectro de absorción caracterizado por una banda muy fuerte cerca de 400 nm y un grupo de 4 bandas entre 500-630 nm que decrecen en intensidad hacia el rojo. De esta manera es posible realizar la cuantificación y determinar la composición de una mezcla mediante espectrofluorometría. Sin embargo, no todas las porfirinas fluorescen, por ejemplo, la protoporfirina IX quelando Fe u otras porfirinas quelando metales paramagnéticos no fluorescen. Por otro lado, si el quelante es un metal diamagnético, se puede observar fluorescencia.

Esta capacidad de fluorecer, hace que algunos pacientes con porfiria presenten fluorescencia en tejidos debido a la acumulación de intermediarios de la síntesis de hemo, por ejemplo en dientes y huesos, o en una muestra de orina, cuando se los expone a una luz UV. Esta fluorescencia hace que se produzcan dentro de las células distintos tipos de radicales de oxígeno y nitrógeno que produce daños a los componentes celulares, llevando de esta manera a eritemas y edemas que producen lesiones erosivas y pérdida de falanges cuando se los expone a la luz solar.

Síntesis del grupo Hemo

La síntesis de grupo hemo consiste en 8 reacciones de las cuales la primera y las últimas 3 se llevan a cabo dentro de la mitocondria, mientras que la segunda a la quinta reaccion ocurren en el citoplasma. La primer de las reacciones es realizada por la enzima Acido δ amino levulinico sintasa (ALA Sintasa), la cual sintetiza el acido δ amino levulínico (δ ALA) a partir de glicina y succinil CoA (Fig 15.5) utilizando piridoxal fosfato como cofactor. Este primer intermediario es de suma importancia pues δ ALA no interviene en ninguna otra via metabólica y una vez formada esta molecula, la síntesis continuará hasta llegar al hemo.

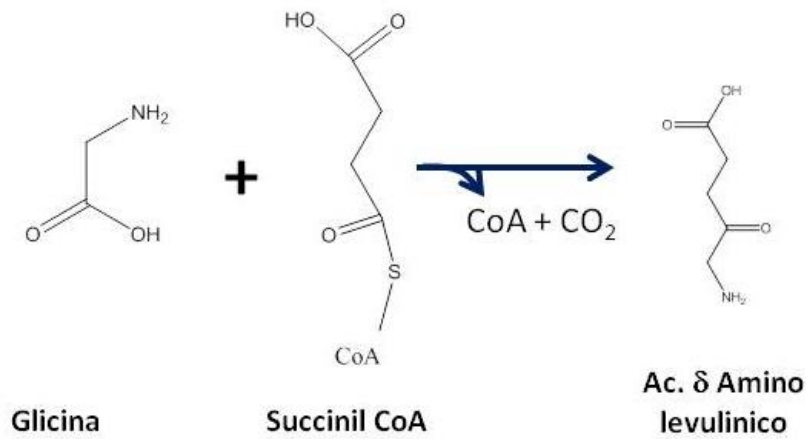


Figura 15.5. Síntesis de Acido δ amino levulinico llevado a cabo por la enzima Acido δ Aminolevulinico Sintasa (ALAS).

Luego de su síntesis, δ ALA es transportado al citoplasma donde es sustrato de la segunda enzima llamada δ ALA Dehidratasa o también llamada Porfobilinogeno Sintasa. Esta enzima, sensible a intoxicaciones con plomo, condensa dos δ ALA para crear un porfobilinógeno (Fig 15.6).

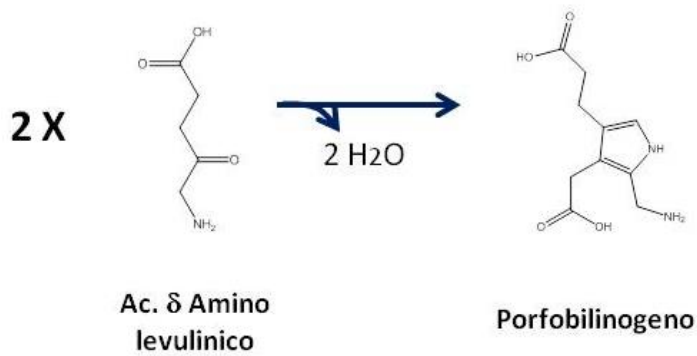


Figura 15.6. Síntesis del porfobilinogeno a partir de dos δ ALA catalizado por la enzima Ala Deshidratasa (o también llamada Profobilinogeno Sintasas).

La siguiente reacción está dada por la enzima Porfobilinogeno desaminasa, la cual produce hidroximetilbilano (Fig 15.7) a partir de cuatro moléculas de porfobilinógeno.

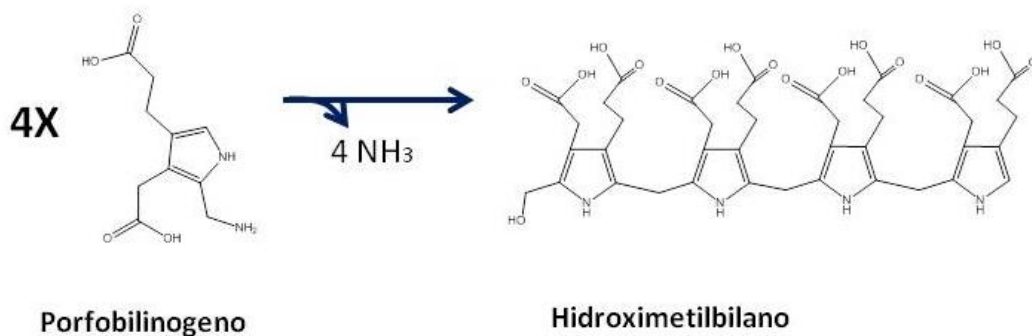


Figura 15.7. Síntesis del Hidroximetilbilano a partir de 4 unidades de Porfobilinogeno catalizado por la enzima Porfobilinogeno Desaminasa.

El hidroximetilbilano tiene dos posibles destinos, formar el macrociclo en forma espontánea, creando el uroporfirinógeno I, o ciclarse mediante la enzima Uroporfirinógeno III Sintasa para dar uroporfirinógeno III (Fig 15.8). Esta enzima forma el isómero III de la serie, rotando el anillo D durante el proceso de ciclado.

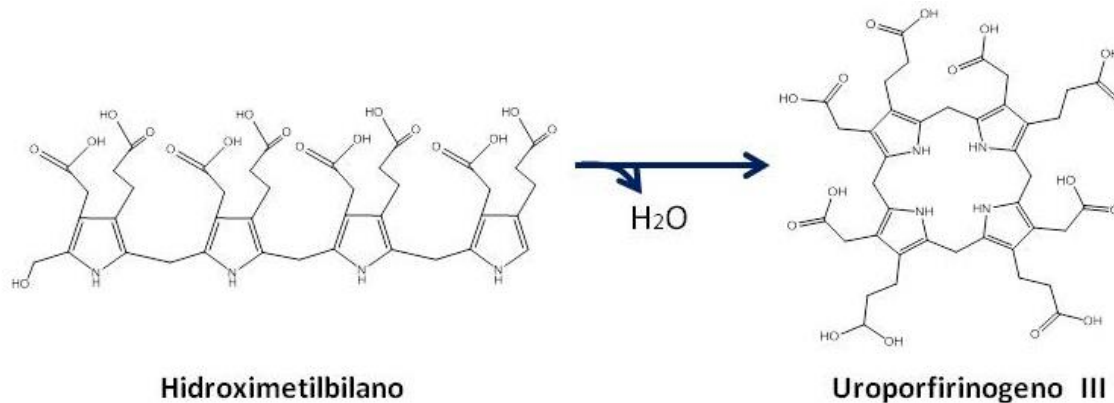


Figura 15.8. Formación del macrociclo tetrapirrólico Uroporfirinogeno III mediado por la enzima Uroporfirinogeno III Sintasa, la cual, durante el proceso de ciclado, invierte el pirrol D para formar el isómero III.

El siguiente paso consiste en realizar la descarboxilación oxidativa de 4 de los 8 grupos carboxílicos, puntualmente, la descarboxilación ocurre en todos los grupos acéticos para crear metilos como sustituyentes (Fig. 15.9). La enzima que produce estas descarboxilaciones es la Uroporfirinógeno descarboxilasa, que tiene como sustrato tanto al uroporfirinógeno III como a su isómero I. La descarboxilación ocurre en forma secuencial, obteniendo los porfirinógenos de 7, 6 y 5 grupos carboxílicos como intermediarios de la reacción.

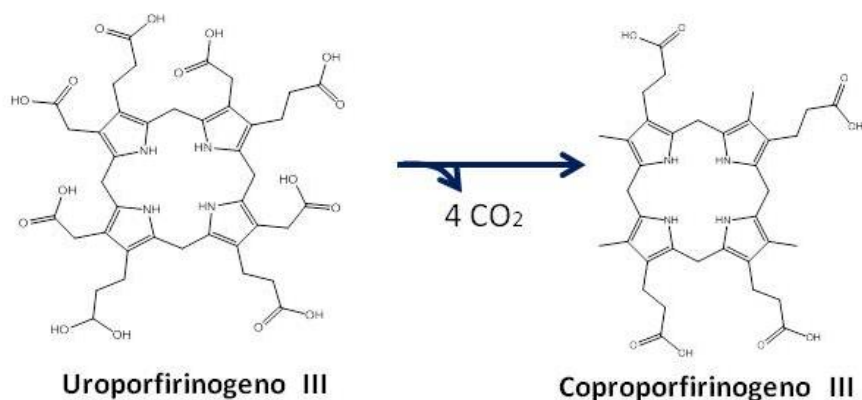


Figura 15.9. Síntesis del Coproporfirinogeno III mediado por la enzima Uroporfirinogeno Descarboxilasa. Es importante recordar que el Uroporfirinogeno I también es sustrato de esta enzima

Una vez formadas ambas coproporfirinas (I y III), solo el isómero III es capaz de entrar a la mitocondria y continuar con la síntesis de Hemo. El coproporfirinogeno III es sustrato de la enzima Coproporfirinogeno III oxidasa formando el Protoporfirinógeno IX (fig 15.10), lo cual se logra gracias a la descarboxilación oxidativa de los grupos propiónicos de los anillos A y B, para formar grupos vinilos como sustituyentes.

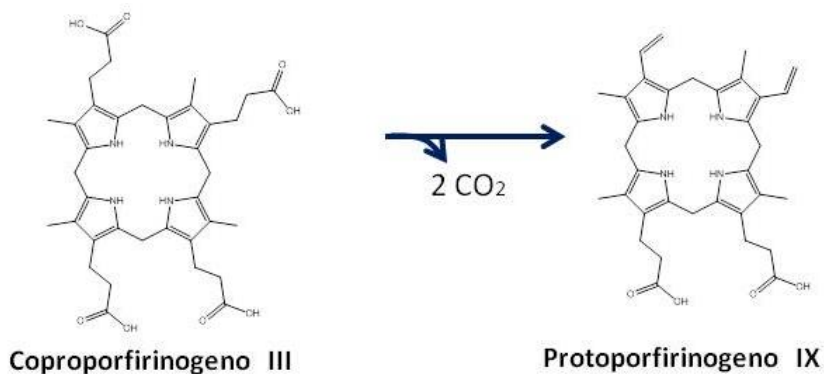


Figura 15.10. Síntesis del Protoporphirinogeno IX catalizado por la enzima Coproporphirinogeno III Oxidasa.

El siguiente paso de la reacción también es una oxidación, pero en este caso ocurre sobre el anillo tetrapirrólico (Fig. 15.11). Esta reacción está catalizada por la enzima Protoporphirinógeno oxidasa, que produce como producto la Protoporfirina IX.

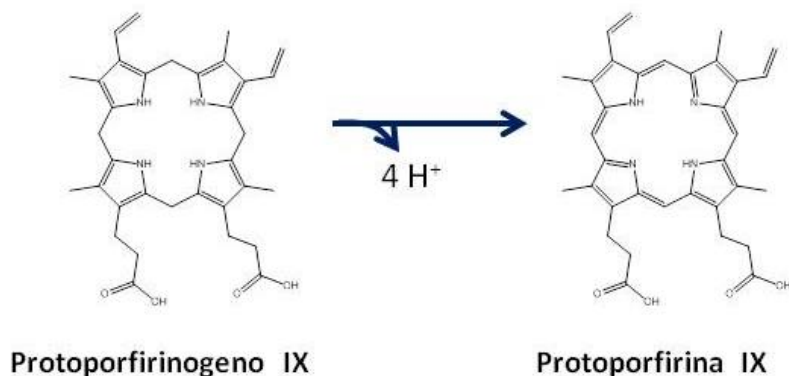


Figura 15.11. Oxidación del Protoporphirinogeno IX para dar Protoporfirina IX mediado por la enzima Protoporphirinogeno Oxidasa.

El último paso de la síntesis de hemo es la incorporación del átomo de Fe^{+2} (Fig 15.12), una reacción catalizada por la enzima ferroquelatasa.

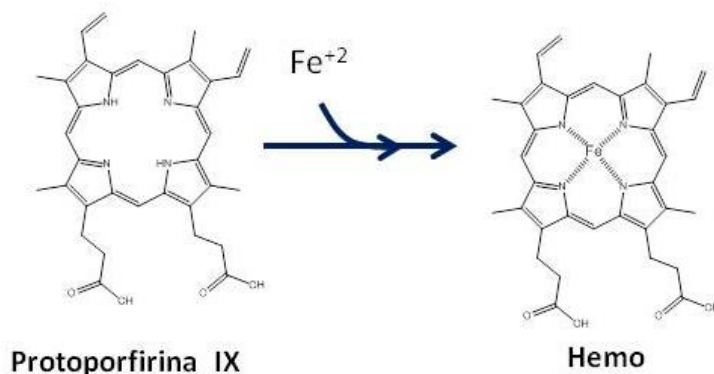


Figura 15.12. Incorporación de un átomo de Fe^{+2} a la Protoporfirina IX para formar el grupo Hemo, reacción catalizada por la Ferroquelatasa.

En la figura 15.13 se puede observar un esquema de la síntesis del Hemo donde se describe la secuencia de reacciones que involucra a las 8 enzimas, los intermediarios y los dos compartimientos celulares involucrados.

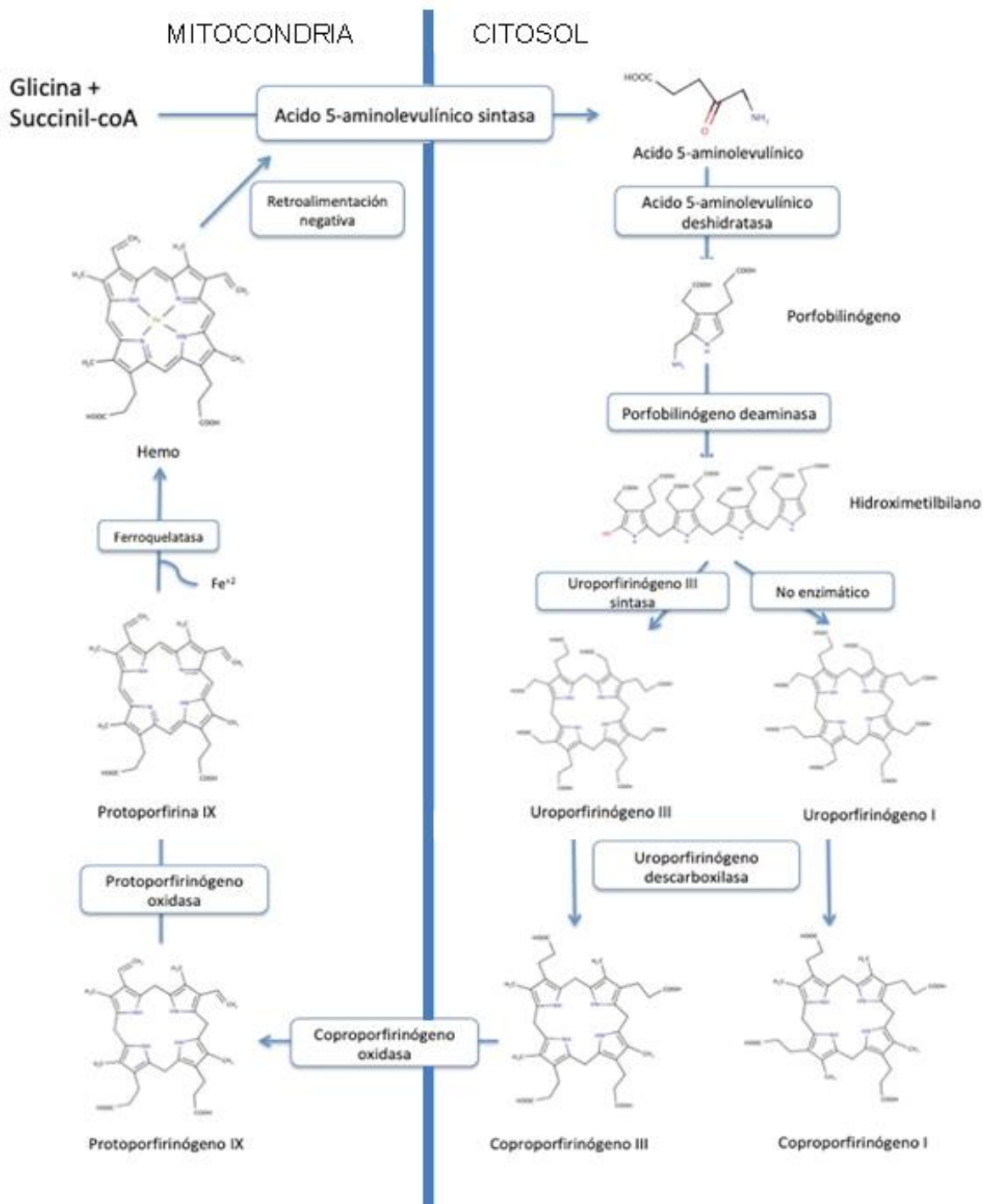


Figura 15.13. Síntesis del grupo Hemo. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

Regulación de la síntesis del Hemo

Una vez formado el primer intermediario de la ruta metabólica, el δ ALA, la síntesis prosigue hasta la formación del Hemo, siendo la síntesis de ALA un paso importante para regular la vía metabólica. Los dos órganos principales donde corre la síntesis de hemo, hígado y médula ósea,

expresan dos isoenzimas de ALA sintetasa que son reguladas en forma diferente. La ALAS-1 o ALAS-N es la ALA sintetasa que se expresa en el tejido hepático, mientras que la ALAS-2 o ALA-E, es la isoenzima que se expresa en los precursores de los glóbulos rojos. Ambas isoenzimas poseen distintos tipos de regulaciones y esto se debe a que las funciones del hemo en estos órganos son distintas. En el hígado, la expresión de la enzima ALA-1, permite una respuesta rápida en función de los requerimientos metabólicos, mientras que en los precursores de los glóbulos rojos, la regulación permite un estado constante y elevado dependiendo de los niveles de hierro.

La regulación de la enzima ALAS-1 en el hígado está fuertemente vinculada a los niveles intracelulares de hemo, los cuales inhiben la expresión no solo a nivel de la transcripción y traducción del gen sino que también su translocación a la mitocondria, pero no inhiben la actividad de la enzima. En una serie de experimentos se observó que para disminuir la actividad de la enzima ALAS-1 se necesita una concentración intracelular de 10^{-5} M de hemina (análogo del hemo) mientras que para la inhibición de la transcripción, traducción y translocación se necesita de una concentración de 10^{-8} M del mismo análogo; es decir, se necesita 1000 veces menos de hemo para inhibir la síntesis de ALAS-1 que la actividad de esta enzima. Se ha planteado la existencia de un pool de hemo libre intracelular, del cual proviene del hemo que acaba de ser sintetizado pero que aun no se ha unido a proteínas o de los hemos que se disocian de diversas proteínas sobre todo de la triptófano pirrolasa la cual posee una constante de disociación de 10^{-8} M, coincidente con la concentración necesaria para inhibir la síntesis del grupo hemo (Fig 15.14). De esta forma, se ha propuesto que este pool de hemo libre, en equilibrio con la triptófano pirrolasa reprimiría la síntesis de la ALAS-1.

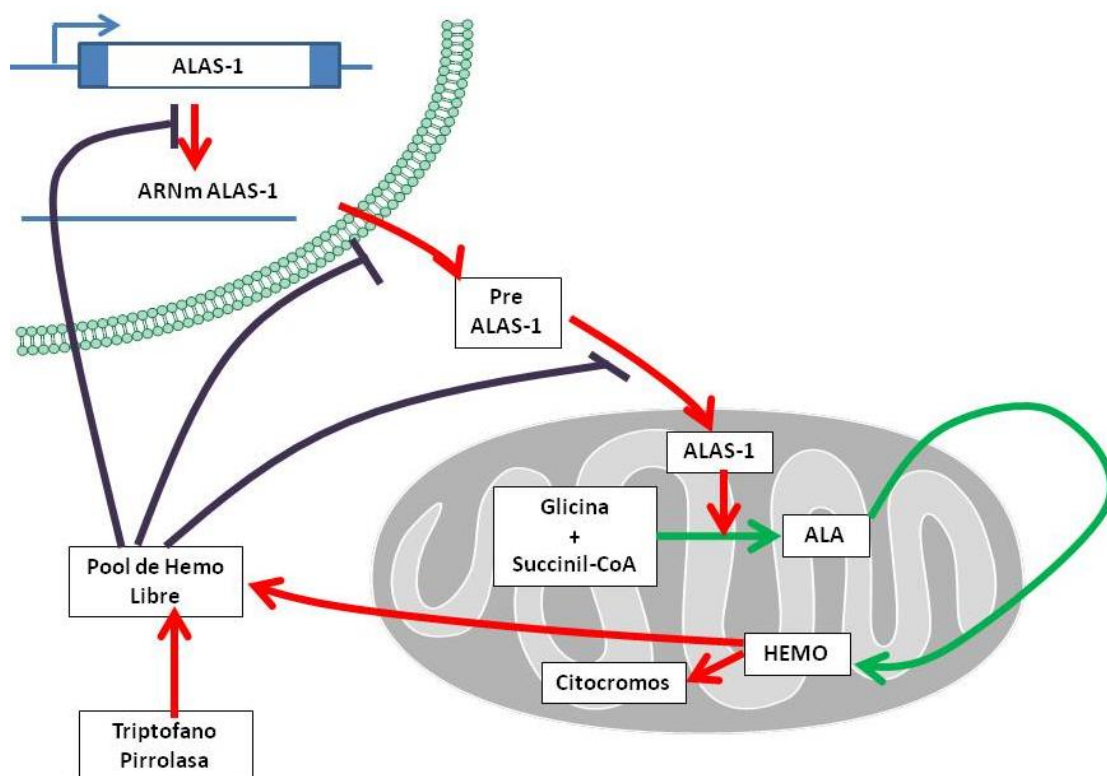


Figura 15.14. Formación del pool de Hemo libre y su capacidad de regular la síntesis de ALAS1. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

Contrariamente a la regulación de la ALAS-1, la ALAS-2 no es regulada en forma negativa por el hemo. La síntesis de esta enzima está regulada por el mecanismo IRE-IRP y además, como la síntesis de la hemoglobina concluye cuando madura el glóbulo rojo, el hemo estimula la síntesis de las globina y de esta forma se asegura que la síntesis de hemo y de las proteínas estén en forma equilibradas (fig 15. 15). Al final, cuando el glóbulo rojo madura y no hace falta continuar produciendo hemoglobina, el hemo inhibe la captación del Fe.



Figura 15.15. Regulación de la síntesis del Hemo en precursores de eritrocitos.

En cuanto a los tejidos extrahepáticos y extraeritropoyéticos, la regulación de ALAS es desconocida, pero se sabe que es distinta a lo que ocurre en hepatocitos y a los precursores de los glóbulos rojos. Por otro lado, en el hígado fetal, que es el encargado de la eritropoyesis fetal, la ALAS es refractaria al hemo como en las células eritroide, siendo su regulación de forma similar a la de medula ósea adulta.

Porfirias

Las porfirias son un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por un bloqueo en la síntesis del hemo con acumulación de sus precursores. Estas enfermedades son hereditarias o adquiridas y resultan de la deficiencia en la actividad de alguna de las enzimas involucradas en esta ruta metabólica, a excepción de la ALA-S, la cual produce anemia sideroblástica X-ligada. En la tabla 15.1 se muestran las distintas porfirias que se desencadenan según el bloqueo en la síntesis del hemo y su clasificación. Las porfirias se las clasifican en hepáticas y eritropoyéticas, dependiendo el sitio primario de expresión de la enzima disfuncional prevalente. Sin embargo, una clasificación más apropiada es la que las agrupa en agudas o no agudas, es decir, aquellas porfirias que generan ataques agudos o no.

Tabla 15.1

Enzima	Porfiria	Herencia	Clasificación	Ataque Agudo	Manifestaciones
ALA Deshidratasa	Def. de ALA Deshidratasa	AR	Hepática	Si	Neuroviceral
PBG Deaminasa	Intermitente Aguda	AD	Hepática	Si	Neuroviceral
Uroporfirinogeno III Sintasa	Eritropoyetica Congenita	AR	Eritropoyética	No	Cutáneas
Uroporfirinogeno Descaboxilasa	Cutanea Tarda	Variable	Hepática	No	Cutáneas
Coproporfirinogeno Oxidasa	Coproporfiria Hereditaria	AD	Hepática	Si	Neuroviceral y Cutáneas
Protoporfirinogeno Oxidasa	Variegata	AD	Hepática	Si	Cutáneas y Neurovicerales
Ferroquelatasa	Protoporfiria Eritropoyetica	AD	Eritropoyética	No	Cutáneas

Generalmente, los síntomas de un ataque agudo pueden asociarse a la disfunción del sistema nervioso autónomo, periférico y central. Muchas personas que sufren un ataque agudo presentan severo dolor abdominal y en la zona de la espalda, producto de una neuropatía autónoma con la cual se relacionan todos los síntomas iniciales. Estos se caracterizan por ser inespecíficos como náuseas, vómitos, diarrea, constipación, taquicardia, sudoración abundante, hipertensión, así como fiebre, debilidad muscular y en estados más avanzados puede presentarse parálisis respiratoria y variedad de signos psiquiátricos y neurológicos. La parálisis respiratoria puede progresar hasta el coma y la muerte, llegando la tasa de mortalidad hasta el 10%, si el paciente no se diagnostica a tiempo.

Se postularon distintos mecanismos que podrian desencadenar al desarrollo de la sintomatología del ataque porfírico, tales como:

Exceso de porfobilinógeno y δ ALA que causarían toxicidad en neuronas.

El aumento de la concentración de δ ALA en ciertas regiones del cerebro puede inhibir la liberación de ácido gamma-amino butírico (GABA).

Durante el cuadro porfírico, la deficiencia de hemo puede provocar cambios degenerativos en el sistema nervioso central.

La deficiencia en triptófano pirrolasa puede causar un descenso en los niveles de melatonina plasmáticos que resultaría en una pérdida de protección contra la peroxidación lipídica.

Ataque agudo

Algunas porfiria pueden provocar en sus pacientes ataques agudos de porfiria. La predisposición a sufrir estos ataques está fuertemente vinculada a factores ambientales o adquiridos, exposición a

drogas porfirinogénicas, esteroides y químicos sintéticos, naturales o incluso endógenos. En la literatura se pueden encontrar sustancias, factores nutricionales o fármacos para los pacientes, que se clasifican en “inseguros”, “probablemente inseguros”, “probablemente seguros” y “seguros”, siendo esta última la lista más pequeña. Dentro de los inseguros, solo para citar algún ejemplo, se puede encontrar el diclofenac, rifampicina o incluso la progesterona. En la figura 15.16 se describen los mecanismos por los cuales distintos tipos de drogas pueden producir una disminución de los niveles de hemo del pool regulatorio; de esta forma, al disminuir el hemo libre, la ALAS-1 se expresa y la ruta de síntesis se lleva a cabo. Cuando existe un bloqueo en la síntesis, ciertos intermediarios comienzan a acumularse y a almacenarse, lo que termina con un ataque agudo.

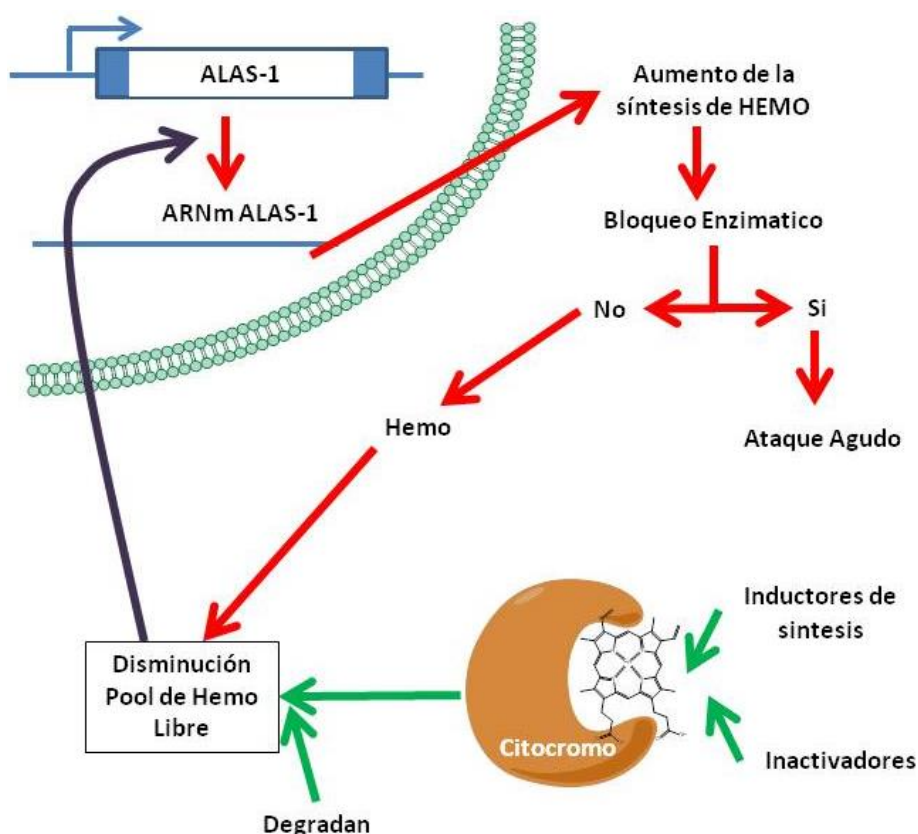


Figura 15.16. Disminución de la concentración de Hemo en el Pool Regulatorio y por lo tanto aumento de la síntesis de la enzima ALAS-1 con consecuente ataque agudo según del bloqueo enzimático. (Imagen adaptada de D'Andrea 2014)

Porfirias Agudas

- ✓ Porfiria Intermitente Aguda (PIA): es la más frecuente dentro de las porfirias agudas.
- ✓ Porfiria por déficit de ALA deshidratasa: es rara, autosómica recesiva. Comparte síntomas con la PIA.
- ✓ Coproporfiria hereditaria (déficit de coproporfirinógeno oxidasa)
- Porfiria Variegata (déficit de protoporfirinógeno oxidasa)

Todos estos tipos de porfiria comparten las manifestaciones clínicas que son principalmente neurológicas. Se produce un cuadro grave, agudo. Por ser la más frecuente se sospecha en principio de PIA, luego se piensa en coproporfiria hereditaria o porfiria variegata y por último en porfiria por déficit de ALA deshidratasa. Se diferencian dosando la actividad de las diferentes enzimas, que tendrán una mutación, en un centro de referencia. En nuestro país se encuentra el Centro de Investigación en Porfirias y Porfirinas, CIPYP, en la Facultad de Cs. Exactas y Naturales de la UBA (<https://cipyp-centro-de-investigaciones-sobre-porfirinas-y.negocio.site>). Se buscan precursores en orina, heces y glóbulos rojos (como ALA y PBG) o las porfirinas que se generan a partir de porfobilinógenos.

Se describirá la Porfiria Intermitente Aguda (PIA) por ser la más común entre las porfirias agudas. En nuestro país tiene una frecuencia de 1:100.000, seguida por la porfiria variegata (1:500.000).

Porfiria Intermitente Aguda

En la PIA la enzima afectada es la porfobilinógeno deaminasa (PBGD), con una reducción del 50% de su actividad enzimática en todos los tejidos; en este caso se acumularán ALA y PBG que aparecerán en orina. Esta enzima tiene una actividad similar a la ALAS 1, al estar reducida pasa a ser el punto de control de la reacción. La PIA se expresa con una herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta y con cierta prevalencia en mujeres en la pubertad. Este hecho se relaciona con las alteraciones hormonales de esa etapa y el que pueden seguir dietas muy estrictas de bajas calorías. Una disminución del 20% del contenido calórico puede desatar un ataque de porfiria. El 90% de los pacientes permanecen latentes y un 10% son sintomáticos.

Afecta al sistema nervioso central, periférico, visceral y autónomo, por lo tanto, dará lugar a manifestaciones clínicas muy variadas e intermitentes que pueden comprometer la vida. Esta patología, permanece latente, sin síntomas. Se la ha denominado también como farmacogénica, porque al exponerse a ciertos factores como drogas, hormonas o cambios nutricionales que tienen la capacidad de influenciar la tasa de biosíntesis de hemo hepática, precipitando la manifestación clínica de la alteración genética subyacente.

El ataque agudo se da de manera intermitente dentro de horas o días. Entre los síntomas clínicos se encuentran, dolor abdominal, taquicardia, síntomas gastrointestinales con náuseas, vómitos, constipación, distensión abdominal. También se presenta con dolores musculares, debilidad, pérdida de sensibilidad; al afectar el SNC se producen síntomas psiquiátricos como depresión, alucinaciones, desorientación, ansiedad, paranoia, puede haber convulsiones (por los vómitos y la disminución de sodio y agua). Debido a la variedad e inespecificidad de síntomas se la ha denominado “Pequeño imitador”, ya que se puede confundir con muchas otras patologías. Los pacientes pueden estar meses visitando distintos médicos sin ser diagnosticados correctamente y no cesar los síntomas. Se requiere un alto grado de sospecha clínica para llegar al diagnóstico de porfiria, ya que no es de las condiciones más frecuentes.

El gen de la PBG deaminasa se expresa en todos los tejidos, pero hay 2 transcritos diferentes, uno para células eritroides y otro para el resto del organos (Fig. 15.17).

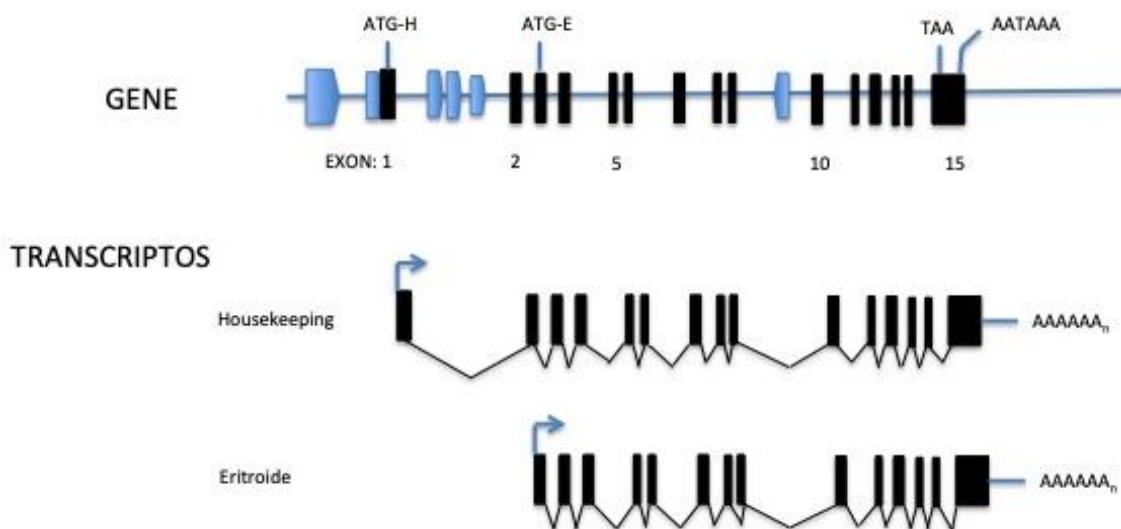


Figura 15.17. Transcritos del gen PBG deaminasa, constitutivo y eritroide. Adaptado de Scriver 2001

Patogénesis de los síntomas neurológicos

Se cree que la mayoría de los signos y síntomas de las porfirias agudas se deben a una disfunción neurológica, aunque los mecanismos que conducen al daño neural no se conocen completamente. Se han podido elaborar varias teorías o hipótesis para explicarlo.

La hipótesis más aceptada es que ALA y PBG que se originan en tejidos no-neurales llegan al sistema nervioso y son neurotóxicas, causando las manifestaciones clínicas previamente descritas. Se ha demostrado que durante el ataque agudo hay aumento en la producción de estos precursores de porfirinas. ALA sintasa 1 no es inducible en cerebro, a diferencia de la ALAS hepática que es inducible por drogas y hormonas que exacerban los ataques agudos. ALA tiene una estructura similar al neurotransmisor ácido gammaaminobutírico (GABA), con lo que es posible que interactúe con sus receptores, aunque se desconoce como este mecanismo podría inducir daños en el sistema nervioso. Los nervios periféricos, que no están protegidos por la barrera cerebro-sanguínea, están expuestos a los altos niveles de ALA plasmáticos, de tal manera que este precursor puede entrar a las células y ser convertido en porfirinas, las cuales podrían ejercer así un potencial efecto tóxico.

Otra hipótesis postula que en el hígado la deficiencia de hemo funcional podría predisponer a una insaturación de la triptófano pirrolasa, lo que llevaría a una alteración en la liberación de triptófano a las neuronas. Esta enzima citosólica regula el metabolismo de triptófano que es precursor de moléculas con actividad neurológica. Un aumento en la producción de serotonina a nivel del sistema nervioso podría contribuir a la disfunción autonómica en las porfirias agudas. La deficiencia de hemo en el sistema nervioso podría dañar la función de otras hemoproteínas, como óxido nítrico sintasa y alterar la formación de GMPc.

Diagnóstico

Ante la sospecha clínica de que la patología sea alguna porfiria, se realiza la búsqueda de precursores en orina, heces, glóbulos rojos y plasma de los pacientes. En el caso de la PIA, ALA y PBG están aumentados en orina. La confirmación se realiza mediante la determinación de la actividad enzimática de PBG deaminasa en glóbulos rojos.

Tratamiento

Si bien la mayoría de los pacientes son asintomáticos, se deberían evitar los factores precipitantes como drogas inductoras de citocromos, dietas estrictas, infecciones, cirugías, consumo de alcohol, anticonceptivos u otros tratamientos hormonales. En caso de que suceda alguna de estas situaciones o se desencadene un ataque agudo de porfirias, se debe tratar la condición que generó el ataque. Si el ataque es leve, con infusiones de glucosa mejora el cuadro clínico, debido a la inhibición sobre la síntesis de citocromo P450, disminuye la exacerbación de hemooxigenasa y se evita una disminución en el pool de hemo citosólico. Si el ataque es más importante, se recurre a la administración intravenosa de hemina o hemoderivados. Se prefiere la hemina dado que presenta menos efectos adversos. De esta forma, ALA y PBG disminuyen rápidamente.

Porfirias Cutáneas o Eritropoyéticas

Las porfirias cutáneas o eritropoyéticas se caracterizan por presentar sensibilidad a la luz solar (longitud de onda = 400 nm). Las manifestaciones clínicas se caracterizan por alteraciones cutáneas que van desde urticaria, alteraciones que van desde transformantes hasta mutilantes. Dentro de estas porfirias están la porfiria eritropoyética congénita (PEC), la porfiria cutánea tarda (PCT), que es la más frecuente y la porfiria hematoeritropoyética (PHE).

Porfiria eritropoyética congénita (PEC)

La PEC es una enfermedad muy rara y la más grave de todas las porfirias eritropoyéticas. Este tipo de porfiria se manifiesta con herencia autosómica recesiva y se produce por deficiencia de la uroporfirinógeno III sintasa, acumulándose isómeros de porfirinas no fisiológicos, anormales como uroporfirina I y coproporfirina I.

Se producen lesiones en piel, susceptibles a infecciones. Esas lesiones son tan graves que llegan a ser mutilantes, pudiendo perder partes de los dedos, del cartílago nasal, orejas y del pelo con la presencia de hirsutismo. De afectarse las córneas, pueden llegar a ceguera. Debido a la presencia de porfirinas en el esmalte dental, presentan eritrodoncia, es decir, coloración rojiza en los dientes, un signo característico.

Manifestaciones clínicas

La edad de comienzo y la severidad de los síntomas son muy variables, pueden ir desde hidrops fetalis debido a anemia hemolítica muy severa *in utero* hasta formas más leves de comienzo tardío en las que solo se presentan lesiones cutáneas en la adultez. Se puede expresar desde la niñez, detectándose en los pañales manchas de coloración rojiza debidas a la presencia de porfirinas. En la mayoría de los casos la fotosensibilidad se desarrolla después del nacimiento, observando en los pacientes que al exponerse a la luz solar, estos niños lloran. Se manifiesta con friabilidad aumentada y piel ampollada en manos, cara y zonas expuestas al sol. Las vesículas y ampollas contienen un fluido seroso, son propensas a rupturas e infecciones que conducen a la formación de cicatrices y deformaciones como también a la pérdida de falanges o, como se mencionó anteriormente, pérdida de rasgos faciales como nariz, orejas o parte de los párpados. La piel puede ser delgada con zonas de hipo e hiperpigmentación, también es prominente la hipertrichosis de cara y extremidades. Además presentan anemia hemolítica (puede ser leve a severa) que es característica, acompañada de anisocitosis, poiquilocitosis, reticulocitosis, eritroblastos y glóbulos rojos cargados con uroporfirinógeno I que son secuestrados por el bazo, lo que conduce a esplenomegalia. Puede haber también, disminución en plaquetas y leucocitos, aumento de bilirrubina no conjugada mientras que el recambio de hierro plasmático se encuentran aumentados. En este caso, si la médula ósea no es capaz de compensar esa anemia, los pacientes deben ser transfundidos y considerar como tratamiento el trasplante de médula ósea. La esperanza de vida de estos pacientes puede estar marcadamente disminuida en los más severamente afectados debido a complicaciones hematológicas y el riesgo aumentado de infecciones.

Diagnostico

En el laboratorio se observa aumento de UPBG I en todos los tejidos y fluidos, ya que hay uroporfirinógenos y coproporfirinógenos, intermediarios de descarboxilación (se hallan hexa, hepta y pentacarboxilporfirinas), con predominancia del isómero I, no fisiológico. Por lo tanto, se procede a la detección de uroporfirinas en plasma, orina y glóbulos rojos. El diagnóstico definitivo se realiza mediante la determinación de actividad enzimática de la UPBG III sintasa. El defecto enzimático es una actividad de UPBG III sintasa marcadamente deficiente pero no totalmente ausente. La mayoría de los pacientes con PEC tiene menos del 10% de la actividad normal de la enzima mientras que portadores heterocigotas tienen aproximadamente 50% de actividad. Las alteraciones genéticas que dan origen a esta deficiencia son mutaciones missense o nonsense, grandes y pequeñas deleciones como también inserciones, defectos de splicing y mutaciones de puntos de ramificaciones en intrones.

Tratamiento

El tratamiento se centra en la sintomatología. Estos pacientes deben tener la mayor parte del cuerpo cubierta con ropa, usar pantallas solares que eviten la longitud de onda en la banda de Soret en las partes libres. Deben minimizar su exposición a la luz solar. Los síntomas debido a

fotosensibilidad pueden generar un espectro muy amplio en los que algunas tal vez solo tengan urticaria solar. Estas manifestaciones se producen debido a que el O₂ del plasma sumado a la luz solar generan radicales libres. La deslocalización de electrones al ser excitados por la luz, atacan las membranas (los dobles enlaces de las moléculas) afectando así la permeabilidad de las mismas, principalmente en lisosomas, que causan la liberación de proteasas y degradan los tejidos, lo que puede terminar en necrosis.

Porfiria cutánea tarda (PCT)

La PCT es la más frecuente de las porfirias y engloba un conjunto heterogéneo de procesos que conllevan un déficit de la uroporfirinógeno descarboxilasa (UROD) hepática. Se manifiesta a mediana edad, en la mayoría de los casos después de los 40 años. Como consecuencia de ese déficit, se produce una acumulación de uroporfirinas y porfirinas parcialmente descarboxiladas en hígado, plasma y orina, que se oxidan irreversiblemente. Se depositan en la piel y ante la exposición solar provocan el cuadro clínico de la enfermedad.

Se la ha clasificado en 3 subtipos:

- ✓ **Tipo I o esporádico:** corresponde al 75-80% de los casos de PCT. Se caracteriza por una deficiencia adquirida de actividad de UROD de aproximadamente el 50% que se limita al tejido hepático, con actividad conservada en el resto de los tejidos. Se postula que se debe a un origen adquirido a través de la interacción de diversos factores ambientales, con una predisposición genética que parece favorecer un mecanismo de daño por alteración del metabolismo oxidativo del hierro en el hígado. Se asocia a distintos factores desencadenantes como sobrecarga de hierro, ingesta de alcohol, estrógenos e infección por hepatitis C, entre otros.
- ✓ **Tipo II o familiar:** corresponde al 20-25% de los casos de PCT. Se caracteriza por una herencia autosómica dominante pero con baja penetrancia. La actividad de UROD también es del 50% pero afecta a todos los órganos. Existen diferentes mutaciones que incluyen deleciones e inserciones, las que en su mayoría no producen alteraciones del sitio activo sino que producen enzimas de baja estabilidad o que causan un splicing del mRNA alterado.
- ✓ **Tipo III:** similar al tipo I, con disminución de actividad de UROD en hígado pero con asociación familiar.

Se ha descrito PCT tóxica que se origina por exposición a tóxicos como los hidrocarburos polihalogenados y herbicidas triacinos que causan enfermedad dependiente de la dosis.

Otro tipo de porfiria debido a déficit de UROD es la **porfiria hepatoeritropoyética**, que es rara y se manifiesta en los primeros años de vida. Es causada por mutaciones en la enzima en homocigosis o heterocigosis doble (al menos una de las mutaciones no debe causar pérdida total de la función para ser compatible con la vida). La actividad enzimática está reducida a un 5-10% del valor normal.

La prevalencia de PCT es muy variable y se ha reportado entre 1:5000 y 1:25000.

Manifestaciones clínicas

Los síntomas son principalmente cutáneos, con alteraciones hepáticas. El tipo esporádico o tipo I se manifiesta en la adultez mientras que la PCT familiar o tipo II es más precoz. El principal síntoma es la fotosensibilidad con manifestaciones cutáneas en áreas expuestas, sobre todo en cara, brazos y dorso de las manos. Las lesiones no son específicas, ya que son indistinguibles de las que se producen en otros tipos de porfirias cutáneas. Las lesiones vesiculosas y ampollas son de pequeño tamaño debido a una fragilidad cutánea muy característica. Esas lesiones se producen después de exposición a luz solar o de pequeños traumatismos y tardan semanas en curar, dejando cicatrices atróficas hipo o hiperpigmentadas. La hipertrichosis es habitual, sobre todo en la zona malar y periorbitaria, en ocasiones también en orejas y brazos. Puede haber hiperpigmentación cutánea en zonas de exposición solar. La anatomía patológica de las lesiones muestran como alteración más específica el depósito de un material perivascular hialino y amorfo, PAS-positivo, en la dermis y unión dermo-epidérmica. No hay infiltración inflamatoria, sí depósito de IgG y complemento en la unión dermi-epidérmica. En biopsias hepáticas de pacientes con PCT se ha encontrado siderosis, esteatosis y cristales intracelulares de porfirinas. El hallazgo de autofluorescencia roja en el estudio con luz UV es característico de PCT y se debe al aumento de porfirinas en el tejido hepático. Pueden observarse agujas birrefringentes como inclusiones citoplasmáticas que son específicas de PCT y se deben al acumulo de uroporfirinas. Las pruebas de función hepáticas están alteradas, sobre todo las transaminasas y la gammaglutamil traspeptidasa. En 50% de los pacientes se presentan alteraciones tipo necrosis lobular o tractos de fibrosis. La enfermedad hepática es más severa en los casos donde hay infección por hepatitis C, ingesta excesiva de alcohol o sobrecarga férrica como factores predisponentes.

Diagnóstico

Las lesiones cutáneas no son específicas, por lo que se debe recurrir a determinaciones bioquímicas y de actividad enzimática para arribar a un diagnóstico de certeza. Las porfirinas están elevadas en hígado, orina, heces y plasma. El patrón es complejo ya que se producen porfirinógenos con distinto número de grupos carboxilo (octa, hepta, hexa, penta-carboxiporfirinógenos) de los isómeros I y III. Posteriormente, estos compuestos se oxidan a las porfirinas correspondientes. Valores por encima de 10 µg/dl de porfirinas totales en plasma ya se considera diagnóstico. El diagnóstico definitivo se hace por determinación mediante separación cromatográfica en capa fina o HPLC de los compuestos en orina y heces, donde una relación uro:copro >3 es indicador de PCT. Se puede realizar también la determinación de isocoproporfirinas en heces, que es una vía menor y deriva de porfobilinógenos parcialmente carboxilados, oxidados por una oxidasa. Para diferenciar entre tipo I y III de la tipo II se realiza la determinación de actividad enzimática en glóbulos rojos. Puede requerirse la diferenciación entre PHE y PEC, ya que en ambas hay aumento de porfirinas en glóbulos rojos, pero en PHE aumentan también las isocoproporfirinas y Zn-protoporfirinas en eritrocitos.

Pueden realizarse pruebas complementarias como hemograma completo, hierro, ferritina, serología para HIV, hepatitis C, ecografía hepática.

Tratamiento

En principio, evitar factores precipitantes, principalmente la exposición a la luz solar. Es posible realizar flebotomías, en las cuales se extrae medio litro de sangre cada 1-2 semanas, después de hacerlo 5-6 veces, se normalizan los valores de porfirinas plasmáticas, mejoran las lesiones cutáneas y se deben controlar los valores de enzimas hepáticas.

Se ha implementado el tratamiento con cloroquina que forma complejos con porfirinas, para movilizarlas del hígado; administración de vitamina C y E como antioxidantes y en casos severos, trasplante hepático.

Referencias

- D'Andrea, MF; Mazzetti, MB. La herencia y la toxicidad interaccionan en las Porfirias. *Ciencia e Investigacion*, 2014; 76: 39-57.
- Gásquez Sisteré, I; Mavila, K.L; Chordá Ribelles, J; Touzón López, C. La porfiria aguda intermitente, un problema diagnóstico. *Gastroenterol. Hepatol*, 2010; 33(6): 436-439.
- Herrero, C; Badenas, C; Aguilera, P; To-Figueras, J. Porfiria intermitente aguda: seguimiento a largo término de 35 pacientes. *Med. Clin*, 2015; 145(8): 332-337.
- Sanjurjo, P.; Baldellou, A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Capítulo 52. Ed. Ergon. Madrid, 2014.
- Scriver, C. R; Beaudet, A. L; Sly, W. S; Valle, D.; Childs, B.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. *The Metabolic and Molecular base of inherited disease*. Vol. III, Chapter 124. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 8th edition (2001).

CAPÍTULO 16

Alteraciones del metabolismo de la bilirrubina

Juan Manuel Fernández

Metabolismo de la bilirrubina

La bilirrubina (Bb) es un pigmento tóxico e hidrofóbico derivado exclusivamente de la degradación del grupo hemo de las proteínas hémicas. Su toxicidad, disminuye gracias a su unión en circulación a la albumina. Cuando una proteína hémica debe ser degradada por algún motivo, la porción peptídica se degrada a aminoácidos mientras que el grupo hemo es liberado para ser transformado en bilirrubina.

En humanos, se forman diariamente alrededor de 300 mg de bilirrubina a partir de la degradación de distintas fuentes hémicas, como por ejemplo, hemoglobina, catalasas y hemo libre. En 1971, Schwartz y colaboradores inyectaron en ratas y en humanos, precursores de la síntesis del grupo hemo como glicina marcado con ^{14}C o ácido delta aminolevulinico marcado con ^3H y observaron cómo se elimina esa marca en las sales biliares, en relación al tiempo transcurrido post-inyección. Observaron que las marcas de radioactividad aparecen en dos picos a distintos tiempos (Fig. 16.1). El primero de los picos aparece dentro de los primeros 3 días luego de la inyección, cuyos componentes iniciales (se demostró posteriormente) derivan mayormente de distintas hemoproteínas hepáticas, tales como los citocromos, catalasa, peroxidasa y triptófano pirrolasa y en una menor medida de fuentes eritroides especialmente de hematopoyesis inefectivas producida en la médula ósea y que contiene aproximadamente el 15% de la marca inyectada.

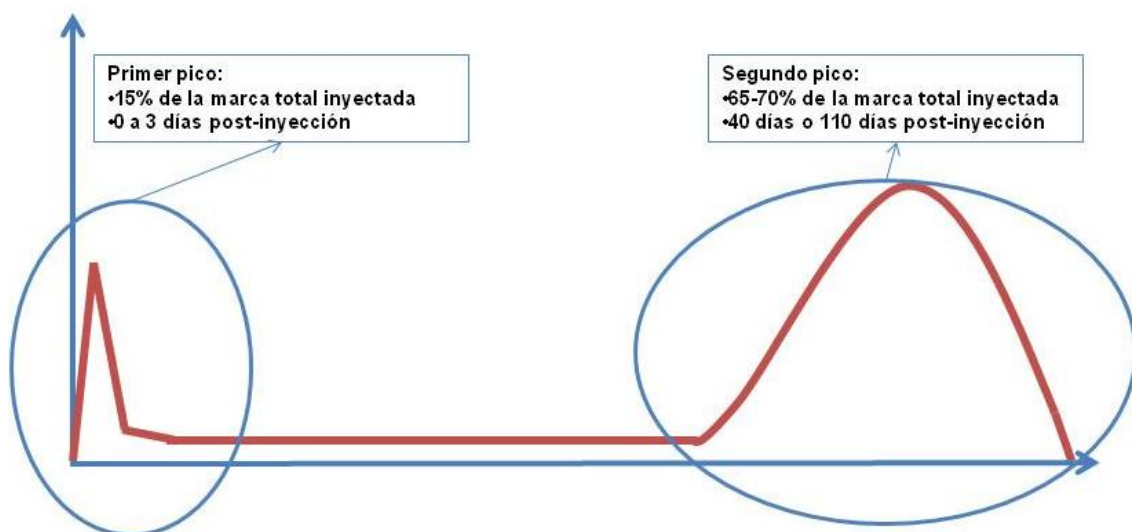


Figura 16.1. Seguimiento de la marca radioactiva en sales biliares durante el tiempo. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

El segundo pico contiene la mayoría de la marca inyectada y aparece a tiempos de 50 o 110 días, dependiendo si la inyección fue en ratas o en humanos, respectivamente y corresponde a la degradación de la hemoglobina de los glóbulos rojos envejecidos.

Con este experimento y otros adicionales, demostraron luego que la mayoría de la bilirrubina es producida en el sistema retículo endotelial luego de secuestrar los glóbulos rojos envejecidos y degradar su hemoglobina. Una vez separado el grupo hemo de las globinas se produce la apertura del anillo de la ferroprotoporfina IX. (Fig. 16.2). La apertura del anillo del grupo hemo se lleva a cabo a través de tres reacciones, siendo dos de ellas mediadas enzimáticamente y una reacción no enzimática.

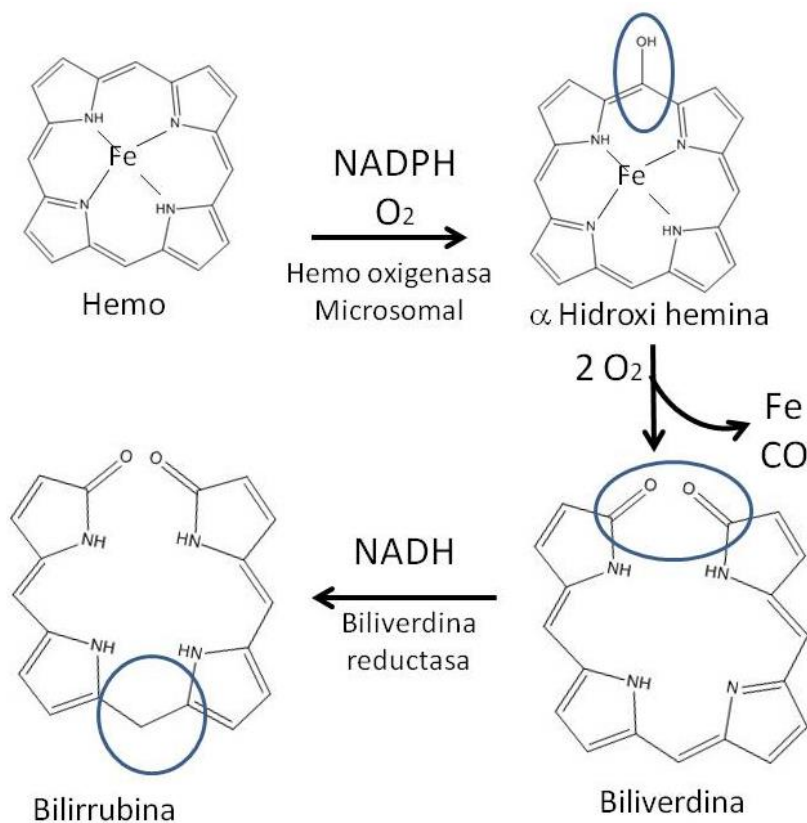


Figura 16.2. Secuencia de reacción para la apertura del anillo tetrapirrólico y producción de bilirrubina. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

El primer paso es la oxidación del puente meteno transformando al grupo hemo en α -hidroxi hemo. Esta reacción está catalizada por la enzima Hemo Oxigenasa Microsomal, la cual requiere O_2 y NADPH . Esta enzima posee alta actividad en el bazo y aumenta su expresión en estados hemolíticos a fin de poder degradar la hemoglobina de los glóbulos rojos envejecidos y secuestrados. Además, ciertas protoporfirinas que se encuentran quelando otros metales (por ejemplo, quelando estaño) se unen fuertemente a la Hemo Oxigenasa Microsomal sin poder ser degradadas, sirviendo estos hemo como inhibidores de la enzima. El segundo paso es la oxidación de los carbonos vecinos del puente meteno utilizando dos moléculas de O_2 y liberando CO y Fe . Esta reacción es no enzimática y el producto final es la biliverdina el cual es un tetrapirrol hidrofílico. El último paso es la conversión de la biliverdina a bilirrubina, reacción que es catalizada

por la enzima Biliverdina Reductasa, la cual requiere de NADPH o NADH. La reducción del puente α meteno por parte de esta última enzima logra convertir una sustancia hidrofílica (la biliverdina) en un compuesto totalmente hidrofóbico (la bilirrubina). Ambas moléculas poseen grupos polares (dos grupos carboxílicos, 4 grupos amina y dos carbonilos) que pueden formar puentes de hidrógeno con el agua y de esta forma la biliverdina resulta en un compuesto hidrosoluble; sin embargo, al reducir el carbono del puente α meteno, éste pasa de ser un carbono insaturado (sp^2) a uno saturado (sp^3), permitiendo la libre rotación de sus enlaces (Fig. 16.3). De esta forma, los grupos polares que podrían formar puentes de hidrógeno con el agua, están involucrados en la formación de puentes de hidrógenos intramoleculares impidiendo su solubilización en solventes acuosos.

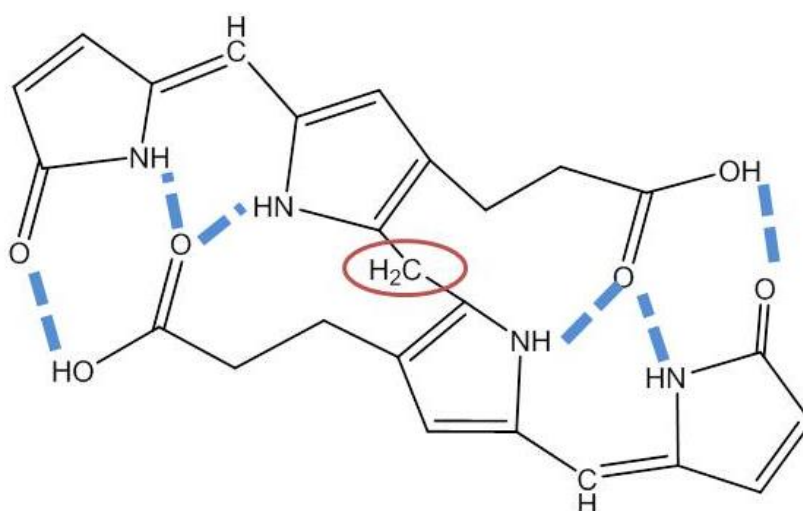


Figura 16.3 Formación de puentes de hidrógeno intramoleculares. El círculo señala el carbono reducido del puente α meteno, lo que permite girar los grupos pirroles para formar los puentes de hidrógenos intramoleculares (en azul). (Imagen adaptada de Scriver 2001)

La formación de estos puentes de hidrógenos intramoleculares se pueden revertir por distintos métodos, por ejemplo el hepatocito los conjuga para poder eliminar la bilirrubina (ver más adelante en este capítulo). Otra forma de romper estos puentes de hidrógenos es mediante la luz UV. Longitudes de onda de alrededor de 450 nm producen ruptura de estos puentes y a su vez pueden girar los distintos anillos pirroles evitando la formación de los puentes de hidrógeno intramoleculares, formando así isómeros hidrosolubles de la bilirrubina, siendo este el fundamento de la fototerapia. En algunas situaciones, por ejemplo, luego de una hemorragia, grupos hemo y hemoglobinas pueden encontrarse en circulación, pudiendo ambos causar daño renal. Para evitar que circulen libre, el hígado produce y libera a circulación dos proteínas llamadas Hemopexina y Haptoglobina, las cuales se unen al hemo y hemoglobina respectivamente formando complejos que luego son absorbidos por el sistema retículo endotelial con el fin de degradarlos y evitar así el daño renal.

La bilirrubina produce sus efectos tóxicos a partir de varios mecanismos. Por ejemplo, se ha demostrado que puede inhibir la síntesis de ADN, ARN o proteínas de varios tipos celulares, desacoplar la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, reduciendo la producción de

ATP, puede inhibir enzimas hidrolíticas, deshidrogenasa, transporte de electrones, e inhibir la actividad de las enzimas proteína quinasa C y de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. Estos efectos tóxicos por parte de la bilirrubina pueden ser prevenidos gracias a su unión a la albumina, la cual además de ser el medio de transporte desde el sitio de productor (mayormente sistema reticuloendotelial) al hígado, funciona como un sistema de protección del organismo previniendo de los efectos tóxicos de la bilirrubina. La bilirrubina se une fuerte pero reversiblemente a un sitio de unión a la albumina, sin embargo, puede unirse a un segundo, tercer y cuarto sitio aunque estas uniones sean mucho más débiles. La unión de otros ligandos a la albumina pueden afectar la unión de la bilirrubina. Por ejemplo, pueden unirse al mismo lugar en que se une la bilirrubina, resultando así en una inhibición competitiva, o no competitiva si se unen a otro sitio. Por lo tanto, un aumento en las concentraciones plasmáticas de estos inhibidores conllevará a una disminución en la unión bilirrubina-albumina aumentando la posibilidad de que se produzcan efectos tóxicos por un aumento en la concentración de bilirrubina libre.

Cuando los niveles de bilirrubina son superiores a 20 mg% en bebés (valores de referencia: entre 0 y 2 mg%), aumenta el riesgo de una encefalopatía llamada **Kernicterus**, los primeros síntomas suelen aparecer dentro de la semana de vida, siendo una mala alimentación, débil reflejo de succión, problemas en el tono muscular asociado con hiper o hipotonía, convulsiones, problemas en la regulación térmica con hipo o hipertermia, lo cual llevando con el tiempo a letargo, atonía y muerte.

Una vez que los grupos hemo son convertidos a bilirrubina, estos son transportados al hepatocito para ser eliminados. Su metabolismo en el hígado puede ser dividido en tres etapas: entrada, conjugación y secreción (Fig. 16.4). El primer paso, la entrada al hepatocito, no se encuentra del todo esclarecida existiendo varias hipótesis descriptas. Como la unión de la bilirrubina a la albúmina es reversible, una pequeña cantidad de bilirrubina puede disociarse de la albumina en el espacio de Disse, siendo absorbida por el hepatocito, bajando así la concentración de bilirrubina libre y provocando de esta forma la disociación. Otro mecanismo posible se basa en que el complejo de albúmina-bilirrubina se puede unir a algún receptor de membrana plasmática y de esta forma se impulsa la liberación de bilirrubina para ingresar a la célula. Una vez separadas, la bilirrubina entra al hepatocito mediante un sistema transportador saturable y competitivo con otras sustancias tales como la bromosulfoftaleína, mientras que la albumina permanece en el espacio extracelular sin entrar a la célula.

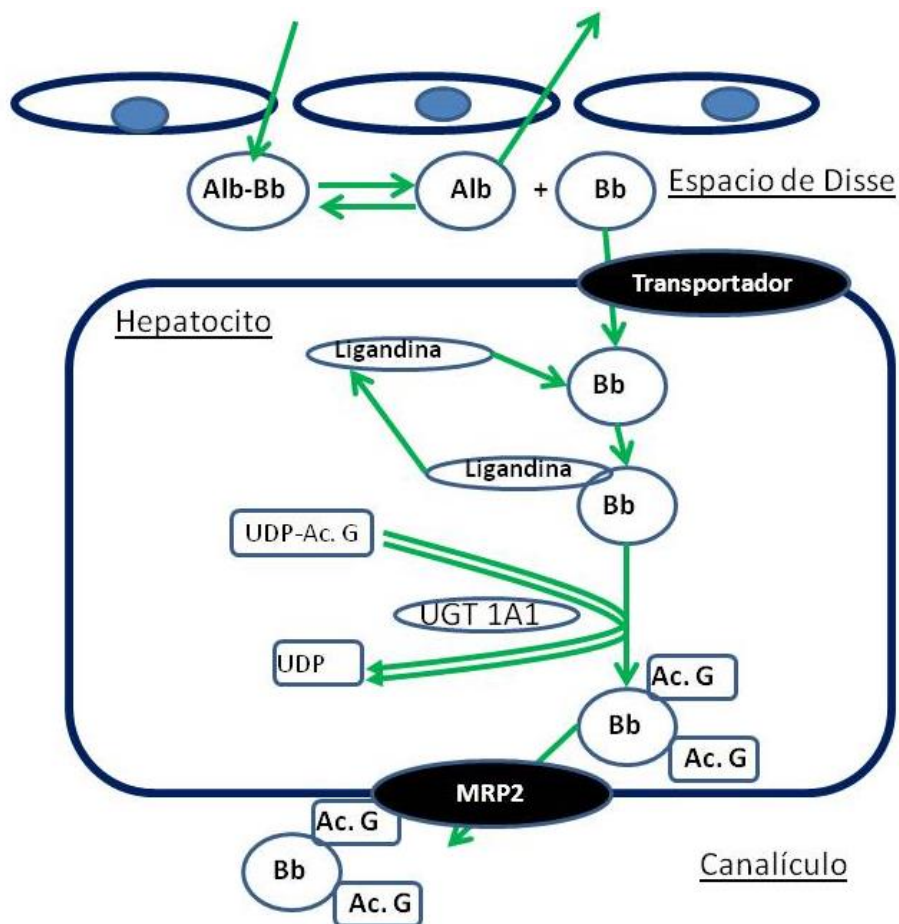


Figura 16.4. Esquema del metabolismo de la bilirrubina dentro del hepatocito donde se observa la entrada, almacenamiento, conjugación y excreción de la bilirrubina. Alb: Albumina; Bb: Bilirrubina; UGT 1A1: UDP glucuronosil transferasa 1A1 UDP-Ac.G: UDP-Acido Glucuronico; Ac. G: Acido Glucuronico; UDP: Uridina difosfato; MRP2: Multidrug Resistance-Associates Protein 2. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

Luego de entrar a la célula, la bilirrubina se une a dos proteínas llamadas proteína Z y proteína Y (también llamada Ligandina). En condiciones normales, la bilirrubina se une mayoritariamente a la Ligandina cuya función es similar a la albumina en sangre, es decir, evitar los efectos tóxicos de la bilirrubina y transportarla al sistema retículo endoplasmático liso donde será conjugada. Se ha descrito que no hay correlación entre la concentración de Ligandina y la velocidad de entrada de bilirrubina a la célula, sin embargo, se ha demostrado que la concentración de Ligandina correlaciona inversamente con la vuelta de la bilirrubina a circulación. La falta de Ligandina, junto con una baja actividad de la UDP-glucuronosiltransferasa por falta de madurez hepática, es una de las causas que puede llevar a los recién nacidos a una ictericia neonatal transitoria no hemolítica.

Una vez dentro de la célula, la bilirrubina cambia su polaridad desde un compuesto hidrofóbico a un compuesto hidrosoluble. Esto se logra gracias a la adición de dos azúcares en los grupos carboxílicos de los grupos propiónicos. Estas adiciones se logran gracias a la enzima Uridina difosfoglucuronato glucuronosiltransferasa (UDP glucuronosil transferasa o UGT). Esta es una familia de enzimas (inducibles por fenobarbital) que se localizan en el retículo endoplasmático de los hepatocitos, poseen distintas especificidades de sustratos, pero todas presentan la función

de llevar a cabo la conjugación con ácidos glucurónicos (obtenidos a partir de UDP ácido glucurónico) de sustratos específicos y convertirlos así en sustancias hidrosolubles para poder luego ser eliminadas. El gen de UGT se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2, consta de una gran cantidad de exones (Fig. 16.5), aunque sus cDNA siempre poseen 5 exones, siendo el exón 1 variable mientras que los exones 2, 3, 4 y 5 son constantes. Hacia la región 5' de cada exón 1, se encuentra el promotor del gen.

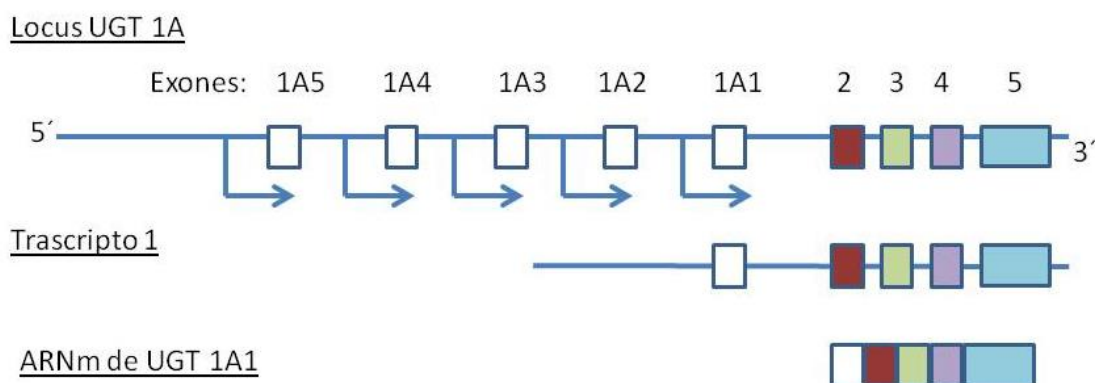


Figura 16.5. Gen de la enzima UGT1A. El gen consta de mas de una decena de exones 1 con su secuencia regulatoria el cual al ser activado formara un ARNm con cinco exones. Los exones del 2 al 5 son exones constantes mientras que el exón 1 es variable y depende el promotor que se haya activado (Adaptado de Scriver 2001).

De esta forma se expresan una familia de enzimas en donde cada isoenzima conjuga una sustancia o grupo de sustancias dependiendo de cual exón 1 se exprese. Por ejemplo, si se expresa el exón 1A1, el cual es constitutivo, la enzima conjugará a la bilirrubina mientras que si se expresa el exón 1A6, la enzima conjugará fenoles.

Luego que la bilirrubina es mono o di conjugada (mayormente es diconjugada), puede ser eliminada por los hepatocitos hacia los canalículos biliares. Esto se logra gracias a un trasportador unidireccional llamado MRP2 (del ingles: *Multidrug Resistance-Associates Protein 2*), antiguamente llamado cMOAT (del ingles: *canaliculas Multispecific Organic Anion Transportes1*). MRP2 utiliza ATP como fuente de energía para trasportar aniones de ácidos orgánicos desde el interior del hepatocito hacia la bilis.

Una vez conjugada y eliminada la bilirrubina, esta es excretada hacia al intestino gracias a las bilis que la trasporta a través de las vías biliares (tanto intrahepatica como extrahepatica). A lo largo del intestino, la bilirrubina conjugada sufre distintas modificaciones, tales como la desconjugación, transformándose en bilirrubina no conjugada, la cual puede ser reabsorbida por el intestino y llegar nuevamente al hígado gracias al sistema venoso portal, para volver a ser eliminada (Fig. 16.6). Otra porción de la bilirrubina conjugada se transforma gracias a las distintas bacterias que se encuentran en la flora intestinal en urobilinógeno, el cual una porción puede ser reabsorbido por el colon, llegando también al hígado para ser luego eliminado también por la bilis o ser eliminado por orina. Una fracción es transformada a estercobilinógeno, el cual también puede ser reabsorbido y volver a ser eliminado por bilis vías circulación enterohepatica. Tanto el

urobilinógeno como el coprobilinógeno pueden ser oxidados a urobilina y coprobilina respectivamente, dándoles el color normal a heces y orina.

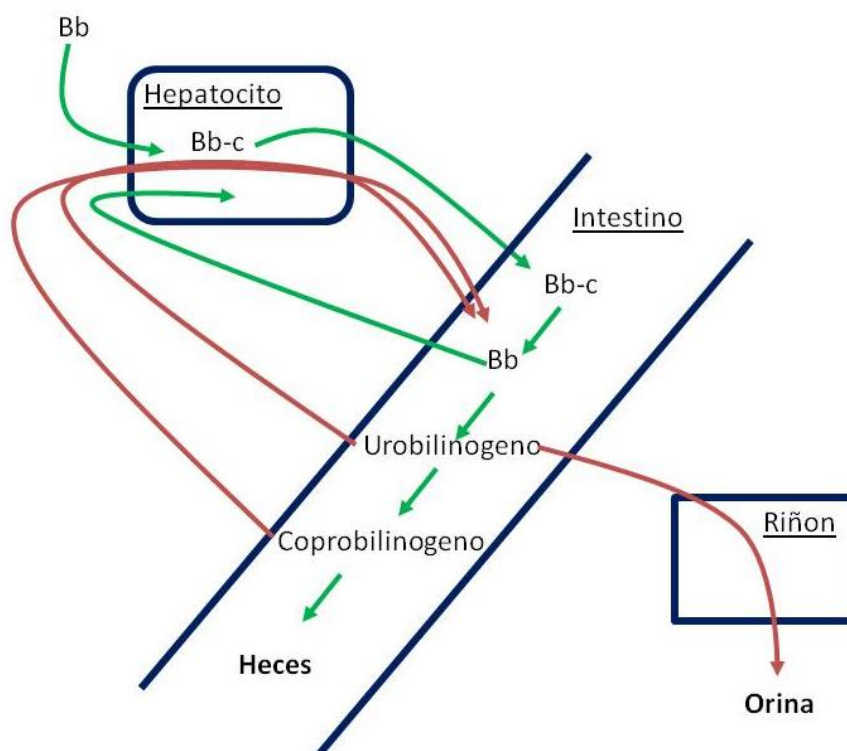


Figura 16.6. Circulación enterohepática de la bilirrubina y distintos productos. En el intestino, la bilirrubina luego de ser desconjugada es absorbida nuevamente para entrar al hepatocito y volver a ser conjugada y secretada. Bb: bilirrubina; Bb-c: bilirrubina conjugada.

Hiperbilirrubinemias

Las hiperbilirrubinemias son un conjunto de trastornos hereditarios que llevan a un aumento de bilirrubina en sangre. Como se puede observar en la figura 16.4, la eliminación de la bilirrubina se puede dividir en cuatro fases distintas: la captación de la bilirrubina desde circulación, el almacenamiento intrahepático mediante su unión a la Ligandina, la conjugación con el ácido glucurónico y por último, la excreción biliar. Cualquier anomalía en algunos de estos pasos producirá una disminución de la eliminación y por ende un aumento de la concentración de bilirrubina en sangre, resultando en una hiperbilirrubinemia. Según la bilirrubina que se acumule, los síndromes ocasionados se los agrupa en:

- 1- Hiperbilirrubinemia con predominio de bilirrubina no conjugada: Síndrome de Crigler Najjar tipo 1, Síndrome de Crigle Najjar tipo 2 (o también llamados Síndrome de Arias) y Síndrome de Gilbert.
- 2- Hiperbilirrubinemia con predominio de bilirrubina conjugada: Síndrome de Dubin Johnson, Síndrome de Rotor.

Existen dos pruebas, las cuales ya no llevan a cabo debido a su toxicidad pero han ayudado a esclarecer las distintas hiperbilirrubinemias, ellas son la administración de Fenobarbital y el aclaramiento de Bromosulfotaleina. La primera de ellas, administración de Fenobarbital, se fundamenta en que esta droga es un inductor de la expresión de varias proteínas y enzimas, entre las cuales se encuentra la UGT1A1. Esta prueba consiste en realizar una administración de fenobarbital y evaluar si disminuyen o no los niveles de bilirrubina en sangre. La segunda prueba se fundamenta en que la Bromosulfotaleina compite con la bilirrubina para ser tomada y ser excretada por el hepatocito. Este anión, al igual que la bilirrubina, debe entrar al hígado, conjugarse (mediante la unión a glutatión, es decir que no compite con la bilirrubina en el paso de conjugación) y luego ser eliminada por el transportador MRP2. Esta prueba consiste en administrar Bromosulfotaleina y evaluar como aclara esta droga en sangre durante a lo largo del tiempo.

Hiperbilirrubinemia con predominio de bilirrubina no conjugada

Síndrome de Crigler Najjar tipo 1

Es una forma de ictericia familiar, con transmisión autosómica recesiva. Se caracteriza por una elevada concentración de bilirrubina no conjugada en sangre que puede superar ampliamente los 20 mg%, se manifiesta en el periodo neonatal persistiendo durante toda la vida. Los análisis demuestran que las funciones hepáticas son normales, es decir, no hay aumento de transaminasas ni de fosfatasa alcalina, ni tampoco se encuentran alteraciones en biopsias hepáticas. Este síndrome se debe a un defecto congénito de la enzima UGT con actividad enzimática nula. Estudios genéticos han demostrado que el gen de la enzima UGT puede presentar diversas pero severas mutaciones, tales como deleciones, inserciones, o la aparición de un codón de stop en cualquiera de los 5 exones o incluso en intrones. Sin el tratamiento adecuado, los pacientes pueden presentar kernicterus y morir dentro de los dos años de vida. Los grandes niveles de bilirrubina no conjugada en sangre con una función hepática normal es diagnóstico de Crigler Najjar tipo 1. El tratamiento está dirigido a tratar de disminuir los niveles de bilirrubina por debajo de 20 mg% y evitar así la encefalopatía y la muerte. Para ello se utiliza la fototerapia con el fin de obtener isómeros hidrofílicos de la bilirrubina gracias a la ruptura de los puentes de hidrógeno. La exposición a una lámpara de luz UV se hace durante 12 horas, produciéndose distintos daños adversos, tales como daños en el ADN de las células de la piel. Además, con el tiempo, este tratamiento pierde eficacia debido a que la piel se engrosa y se pigmenta, disminuyendo así la penetrancia de los rayos UV. Por otro lado, a medida que el bebe crece, disminuye la relación superficie/volumen, disminuyendo la eficacia del tratamiento. Como opción terapéutica también se utiliza la plasmáferesis. Sin embargo, actualmente, el único tratamiento efectivo es el trasplante hepático el cual es utilizado para evitar el riesgo de kernicterus, ya que una vez esta situación se instaura, los daños

neuronales son irreversibles. Actualmente, como alternativa del trasplante hepático, se encuentra en estudio el trasplante de hepatocitos.

Síndrome de Crigler Najjar tipo 2

A diferencia del tipo 1, Crigler Najjar tipo 2 (o también llamado síndrome de Arias), es una patología más benigna. Este es causado también por una deficiencia de la enzima UGT, aunque con actividad enzimática residual, lo que permite que los niveles de bilirrubina total en sangre sean menores a 20 mg%. Sin embargo, la ictericia puede aparecer a partir de la tercera década de vida. Normalmente, la mayor parte de la bilirrubina detectada en bilis es la bilirrubina diconjugada, aunque en este síndrome, la bilirrubina conjugada mayoritaria es la monoconjugada. Clínicamente, los pacientes son normales aunque bajo algunas circunstancias, los niveles de bilirrubina pueden alcanzar (e incluso superar) los 20 mg%. En algunos casos se ha descrito afectaciones neurológicas en pacientes adultos.

Síndrome de Gilbert

Es el síndrome más común, que se presenta con una frecuencia del 2 al 5% de la población. Mayormente, se diagnostica en la edad adulta con una hiperbilirrubinemia levemente aumentada con predominio de no conjugada. Si bien los niveles de bilirrubina en sangre son fluctuantes, generalmente ronda en los 3 mg%. Las evaluaciones a través del laboratorio clínico y los cortes histológicos no demuestran alteraciones hepáticas. Al igual que el síndrome anterior, la bilirrubina mono conjugada es la bilirrubina que se encuentra en mayor proporción en bilis. El genotipo más común en este síndrome es una mutación en el promotor del gen UGT1A1, el cual presenta una inserción de una secuencia TA, lo que lleva a una disminución de la expresión de los niveles de la enzima. Debido a que es un síndrome benigno, una vez realizado el diagnóstico, no hay necesidad alguna de tratamiento. Por otro lado, en algunos grupos de pacientes se ha observado que además de presentar una baja actividad de la enzima UGT1A1 debido a su disminuida expresión, hay una disminución en la captación (y por tanto aclaramiento) del bromosulfotaleína, aunque aún no se ha podido explicar esta asociación.

Administración de Fenobarbital

El fenobarbital es un inductor, entre tantos otros genes, de la enzima UGT1A1. La capacidad de disminuir los niveles de bilirrubina luego de su administración, varía según el síndrome. Por ejemplo, en el caso del Síndrome de Crigler Najjar tipo 1, los niveles de bilirrubina continúan elevados, mientras que en los casos de los Síndromes de Crigler Najjar tipo 2 y Síndrome de Gilbert, la concentración de bilirrubina desciende inclusive a valores normales luego de su administración (Fig. 16.7 A y B)

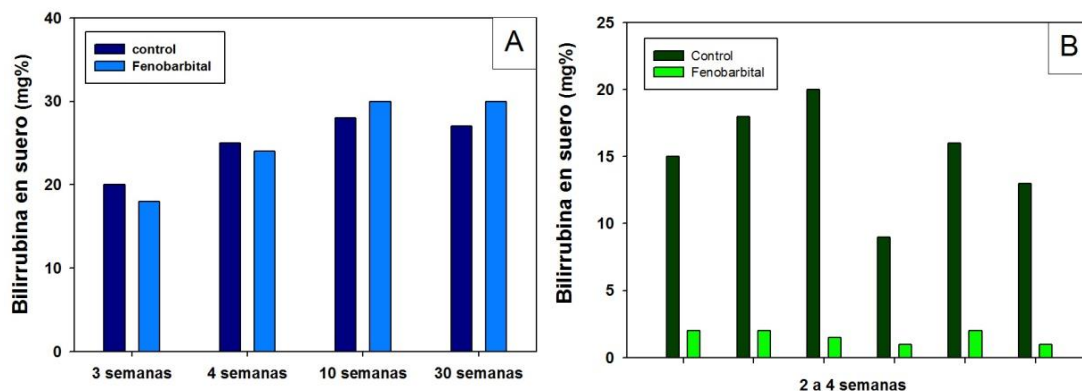


Figura 16.7. Figura A: Grupo de pacientes que no muestran un descenso en los niveles de Bilirrubina en sangre luego de la administración de fenobarbital durante distintos periodos de tiempo. Figura B: Pacientes que luego de la administración durante 2 a 4 semanas de fenobarbital, la concentración de bilirrubina descendió a valores normales. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

En la figura 16.8 se puede observar que en los pacientes con Síndrome de Crigler Najjar tipo 2, los valores de bilirrubina total en sangre disminuye rápidamente hasta llegar a valores normales una vez comenzado el tratamiento con fenobarbital; sin embargo, este efecto solo continua mientras continúe la administración de este inductor y una vez que se discontinua el tratamiento, los valores de bilirrubinemia vuelve a elevarse tan rápido como han disminuido hasta alcanzar los valores propios del paciente.

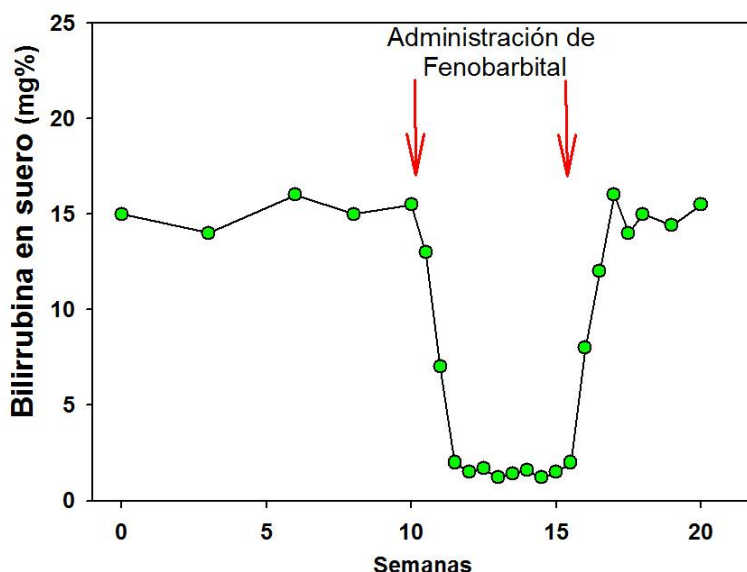


Figura 16.8. Se puede observar como el inicio del tratamiento con fenobarbital (semana 10) produce una disminución en los niveles de bilirrubina en sangre hasta el momento en que se finaliza el tratamiento (semana 15). (Imagen adaptada de Scriver 2001)

Las diferentes respuestas a fenobarbital observadas en pacientes con el síndrome de Crigler Najjar tipo 1 o 2, se explican a través de los diferentes tipos de mutaciones que puede sufrir el gen de la enzima (Fig 16.9). Mutaciones del tipo sustitución, aparición de codón de stop, cambio en el marco de lectura o incluso mutaciones en sitio de splicing conllevan a una actividad enzimática nula para poder realizar la conjugación de la bilirrubina y por lo tanto, el paciente expresará la clínica del Síndrome de Crigler Najjar tipo1. En estos casos, la inducción con fenobarbital producirá el aumento

de la expresión de una enzima sin actividad o con un codón de stop y sin expresión de la enzima, por lo que no será posible disminuir los niveles de bilirrubina. En cambio, pueden existir otro tipo de mutación, tales como sustitución, en donde se expresa una enzima con la actividad residual, necesaria para que los valores de bilirrubina en sangre no se eleven por arriba de 20 mg%; estas mutaciones llevarán a pacientes con una forma de expresión y diagnóstico de Crigler Najjar tipo 2. En estos pacientes, la administración de fenobarbital producirá un aumento de la expresión de una enzima con cierta actividad, la cual logrará disminuir los niveles de bilirrubina plasmáticos.

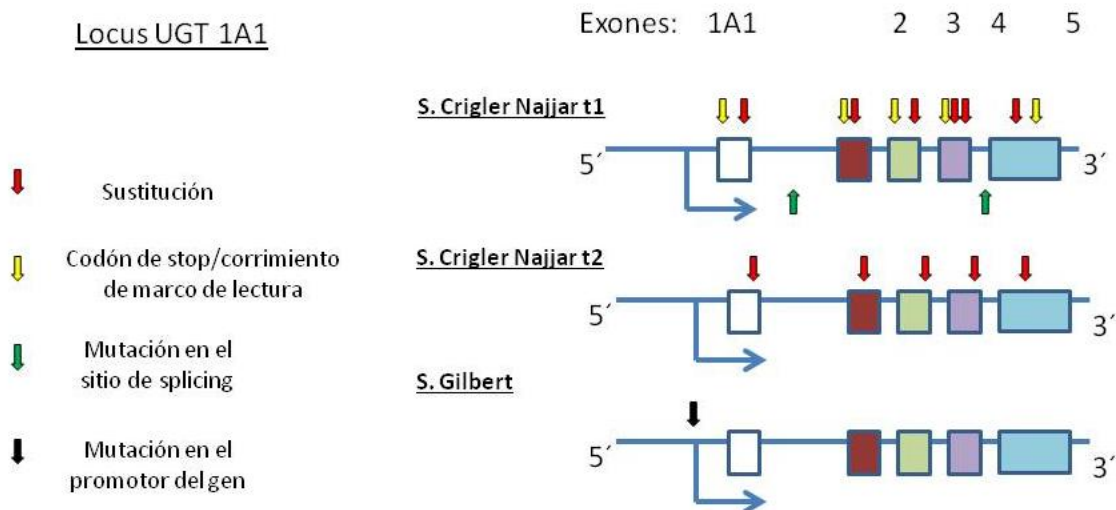


Figura 16.9. Tipos de mutaciones que se pueden presentar en el locus de la enzima UGT1A. (Imagen adaptada de Keularts 2008)

En el caso del Síndrome de Gilbert, la mutación se encuentra en la región del promotor del gen, en este caso la secuencia $A(TA)_6TAA$ cambia a una secuencia $A(TA)_7TAA$. Esta mutación hace que se produzca una disminución de la expresión (y por lo tanto concentración) de la enzima.

De esta forma, se puede hacer un diagrama (Fig. 16.10) donde se observa la relación entre la actividad enzimática, los niveles de bilirrubina en sangre y la severidad en la expresión clínica para cada uno de los síndromes.

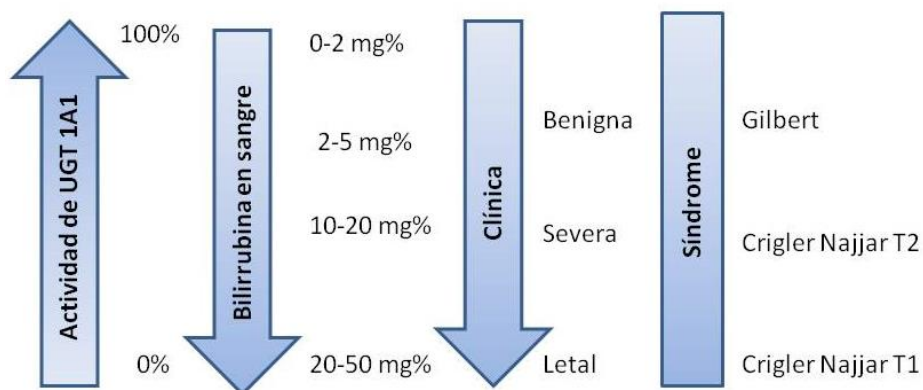


Figura 16.10. Esquema que relaciona la actividad de la enzima UGT1A1 con los niveles de bilirrubina en sangre, clínica y diagnóstico.

Hiperbilirrubinemia con predominio de bilirrubina conjugada

Síndrome de Dubin-Johnson

Este síndrome se presenta con bilirrubina total en sangre elevada con predominio del tipo conjugada. Se expresa como un rasgo autosómico dominante con niveles de bilirrubina en sangre que fluctúa alrededor de 4-5 mg%, aunque en ciertas condiciones, estos niveles pueden aumentar. Con frecuencia, los pacientes pueden referir la presencia de dolores abdominales. Las funciones hepáticas son normales, pero ante un corte histológico de biopsia de hígado puede observarse un órgano negro debido a la presencia de inclusiones intracelulares (aparentemente dentro de lisosomas) que podrían estar formados por polímeros (u oligómeros) provenientes del metabolismo de la adrenalina. El pronóstico es bueno y no requiere tratamiento. En sangre se puede encontrar \square bilirrubina que consta de la unión de la bilirrubina conjugada con la albúmina, aunque también puede unirse a otras proteínas plasmáticas. El parámetro T_{max} (la capacidad secretora de bilirrubina máxima) se encuentra notablemente disminuida, mostrando que este síndrome se debe a una mutación de transportador MRP2. La prueba de aclaramiento de bromosulfaleína demuestran un aclaramiento inicial normal, pero luego de 30 minutos la concentración de este anión se ve aumentada en sangre (Fig. 16.11)

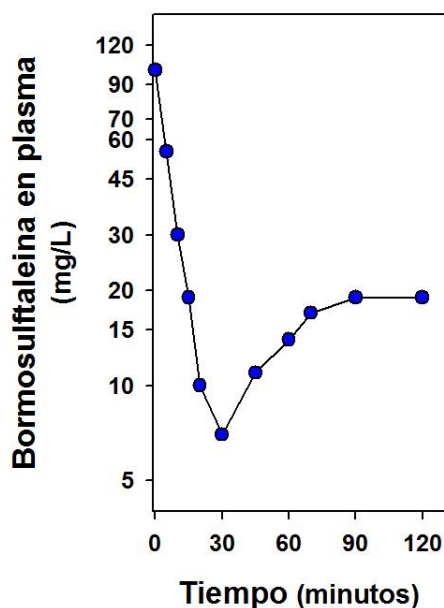


Figura 16.11. Aclaramiento de bromosulfaleína total en sangre.
(Imagen adaptada de Scriver 2001)

Este comportamiento se debe a que hay un reflujo de bromosulfaleína conjugado hacia sangre debido a que no puede ser eliminado al sistema biliar debido a una extremada baja actividad del transportador MRP2. Este comportamiento, si bien es típico de este síndrome, no es utilizado para realizar el diagnóstico debido a que otras patologías pueden manifestar una conducta similar. Para el diagnóstico se utiliza la relación coproporfirina I y III en orina. En personas sin este síndrome, la relación de estas coproporfirinas es de 1/4, es decir que

de las coproporfirinas totales en orina, el 75 % corresponden a coproporfirina III. En pacientes que presentan este síndrome, la relación de coproporfirinas I y III cambia radicalmente, siendo 5/1 con niveles normales de coproporfirina total en orina. Esto significa que ahora la relación se invierte, pasando a ser el isómero I el componente mayoritario (80 %) de las coproporfirinas en orina. Si bien la causa de este cambio no se conoce, se cree que se encuentra afectada la enzima uroporfirinogeno III cosintasa.

Síndrome de Rotor

Este síndrome, al igual que el anterior, cursa con un fenotipo benigno con una concentración de bilirrubina total entre 2 - 5% que en algunas circunstancias puede alcanzar los 20 mg%. Los análisis de laboratorio no muestra disfunción hepática ni tampoco se observan alteraciones en el hígado en muestras histológicas. En cuanto al comportamiento de la administración de bomsulfaleina (Fig 16.12), este muestra un aclaramiento disminuido, aunque sin aparición de un pico luego de 45 minutos de su administración, ni tampoco de este anión conjugado en sangre.

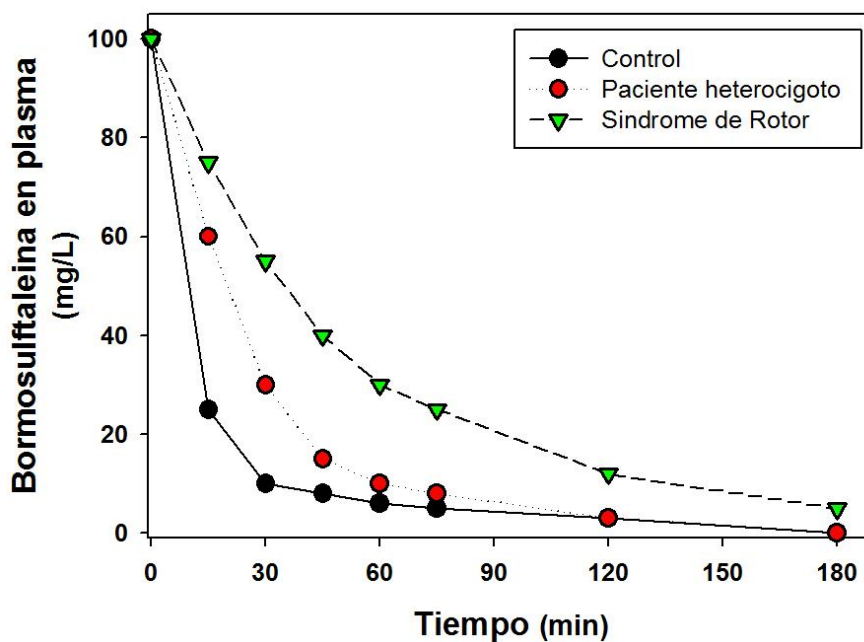


Figura 16.12. Aclaramiento del anión bromosulfaleina total en sangre en pacientes con síndrome de Rotor, pacientes heterocigotos y grupo control. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

En este síndrome también se encuentra afectado el transportador MRP2, sin embargo, el grado de afectación deja una actividad residual (por ejemplo: $T_{max} = 50\%$), lo cual es suficiente para permitir la eliminación de la bilirrubina conjugada aunque con menor velocidad.

Al igual que el Síndrome de Dubin-Johnson se diagnostica mediante de la evaluación de la relación de coproporfirina III/I en orina que es inversa a la normal; pero a diferencia del síndrome anterior, en este caso se observa un aumento en los niveles totales en orina (Fig 16.13 A y B). Por otro lado, en pacientes con Síndrome de Rotor se ha observado una disminución en los niveles de Ligandina.

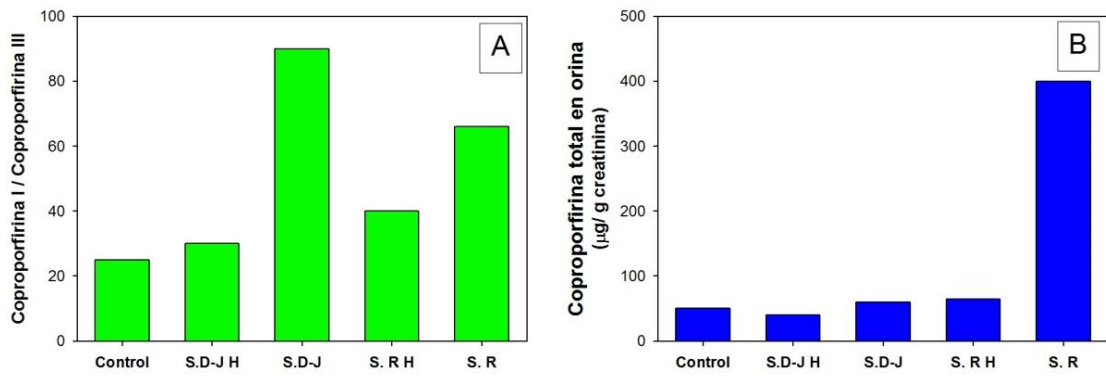


Figura 16.13. A: Relación de coproporfirinas I a III en orina. B: excreción de coproporfirinas totales en orina. S.D-J H: síndrome de Dubin-Johnson heterocigoto, S.D-J: síndrome de Dubin-Johnson; S.R H: Síndrome de Rotor Heterocigoto; S.R: Síndrome de Rotor. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

La figura 16.14 muestra un esquema de las distintas fallas de las hiperbilirrubinemias. La figura 16.14 A representa el metabolismo normal en donde parte de la bilirrubina entra al hepatocito, se conjuga y luego es eliminada a través de las vías biliares. En cambio, en la figura B se observa una disminución de la conjugación y eliminación de la bilirrubina, como serían los casos de Síndrome de Clieger Najjar tipo 2 y Gilbert. En la figura C se esquematiza el caso en que hay una ausencia total de conjugación de la bilirrubina, como pasaría en el síndrome de Crigler Najjar tipo 1. En el caso D y E, hay una conjugación exitosa de la bilirrubina, pero en el caso de esquema D, la eliminación a bilis de la bilirrubina es muy escasa, habiendo reflujo aumentado a sangre (como sucede en el Síndrome de Dubin-Johnson). Por otro lado, en el caso presentado en la figura E, la actividad residual del transportador permite poder eliminar mayor cantidad de bilirrubina conjugada, como sería en los pacientes con Síndrome de Rotor.

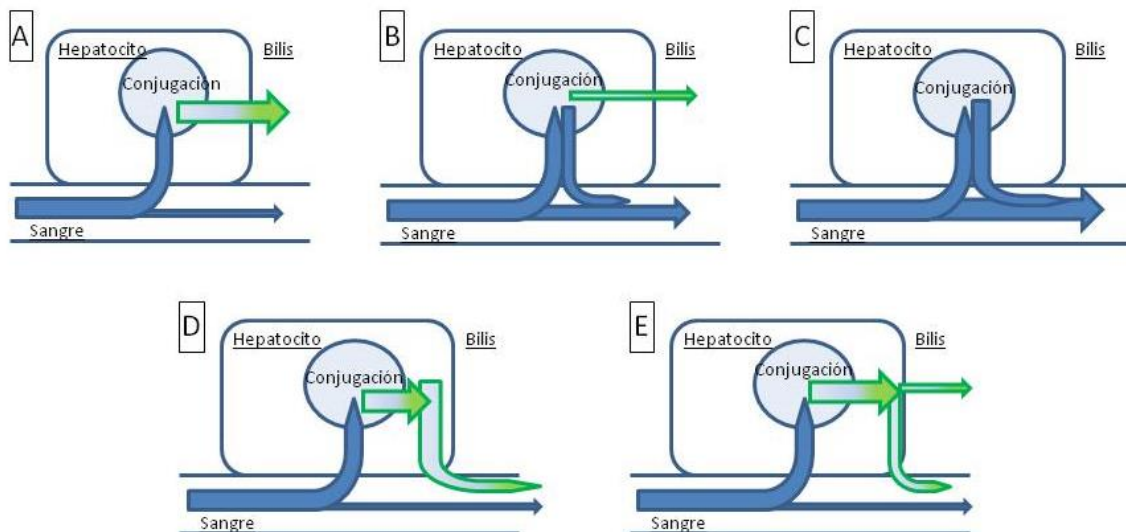


Figura 16.14. Esquema donde se muestra la circulación de la bilirrubina no conjugada (Azul) y bilirrubina conjugada (verde) en sangre, hepatocito y bilis en distintos síndromes.

Ictericia neonatal

La ictericia neonatal es debida a un aumento de la lisis de los glóbulos rojos luego del nacimiento, con una falta de la madurez hepática. Suele ser transitoria y se normaliza con el tiempo. Varias razones puede desencadenar esta ictericia. Una disminución de la captación y conjugación de la bilirrubina, la cual puede producirse debido a que los niveles de Ligandina y UGT1a1 son bajos. A medida que el bebe crece, los niveles de estas dos proteínas aumentan hasta alcanzar los niveles de un individuo adulto. Otro factor a considerar es el aumento de la absorción de la bilirrubina no conjugada en el intestino debido a la flora bacteriana. Además, se ha descrito que la leche materna posee una enzima llamada β glucuronidasa la cual desconjuga a la bilirrubina favoreciendo su posterior absorción. Cuando el bebe a nacido en forma prematura, existe una mayor predisposición a que sufra de una ictericia neonatal.

Referencias

- Agati G, et. al. Bilirubin photoisomerization products in serum and urine from a Crigler-Najjar type I patient treated by phototherapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1998 (47) 181.
- Aono S, et. al. Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. *Lancet* 1995 (345) 958.
- Iyanagi T, et. al. Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998 (1407) 173.
- Keularts, IMLW; van der Meijden, BB; Wielders, JPM. Genotypische bevestiging van syndroom van Gilbert: een geruststelling van de patient. *Ned Tijdschr Klim Chem Ladgennesk*, 2008, 33:43-47.
- Scriver, C. R; Beaudet, A. L; Sly, W. S; Valle, D.; Childs, B.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. *The Metabolic and Molecular base of inherited disease*. Vol. III, Chapter 125. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 8th edition (2001).
- Shan Huang C, et. al. Crigler-Najjar Syndrome Type 2. *J Formos Med Assoc* 2006 (105) 95.
- Torres M, et. al. Síndrome de Crigler-Najjar. *Gastroenterol Hepatol.* 2005 (28) 637.

CAPÍTULO 17

Alteraciones en el metabolismo de Purinas

Ana M. Cortizo

Metabolismo normal de Purinas

Las bases puricas, contituyentes de los nucleótidos son importantes en el organismos para la producción de acidos nucleicos. Las purinas del organismo se originan de dos fuentes, la dieta y la producción endógena. Los principales alimentos ricos en purinas encontramos las carnes rojas, vísceras, mariscos y pescados azules, que como veremos se elimina por orina.

El núcleo de purina consistente en un anillo de pirimidina fundido con otro de imidazol, a través de una serie de pasos utilizando precursores no purínicos. (Fig. 17.1).

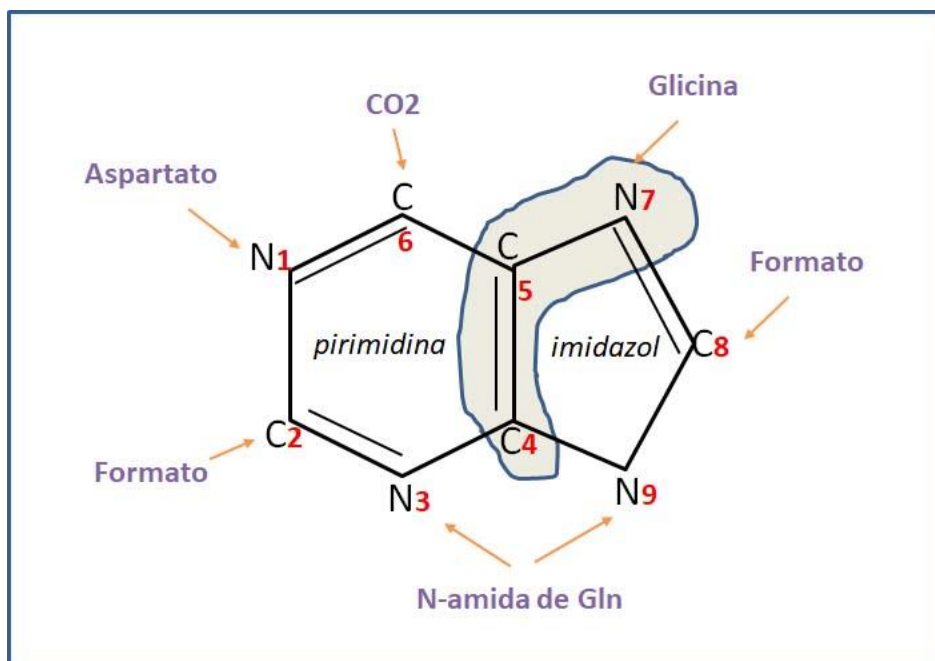


Figura 17.1. Estructura del anillo de Purina y el origen de sus átomos. Adpatado de Lehninger1975

Síntesis de Novo de Purinas

La síntesis de novo de purinas abarca 11 reacciones enzimáticas por las cuales el anillo de purina es secuencialmente construido a partir de moléculas pequeñas donoras, comenzando con

un esqueleto de Ribosa-5-fosfato que produce 5-fosforibosil- α -1-pirofosfato (PPRP) para formar el compuesto purínico progenitor inositol mono fosfato (IMP). Esta primera reacción es catalizada por de *PP-ribosa-P sintasa*, usando como cofactor Mg/ATP y ribosa-5-P. Debido a que PPRP también se utilizada en la síntesis de nucleótidos de pirimidinas y piridinas, así como en la vía de recuperación de bases púricas para nucleótidos de purinas, esta reacción no es el paso limitante de reacción en la síntesis de novo de purinas. Luego PP-ribosa-P se condensa irreversiblemente con L-glutamina para generar 5- β -fosforibosil-1-amina a través de la acción de la enzima *amido-fosforibosil transferasa* (AMPRT). Este es el paso limitante de velocidad para la síntesis de novo. A continuación hay una serie de reacciones que llevan a la construcción y al cierre del anillo de purinas y producen IMP, a partir del cual se van a sintetizar el resto de los compuestos de purinas.

Interconversiones y Catabolismo de Nucleótidos de purinas

A través de una serie de reacción de interconversión de IMP se obtendrán entonces adenilatos y guanilatos, las clases más importantes de nucleótidos de purinas involucrados en la síntesis de RNA y DNA, y a partir de las vías del catabolismo de las purinas, terminando en la formación irreversible de ácido úrico (Fig. 17.2).

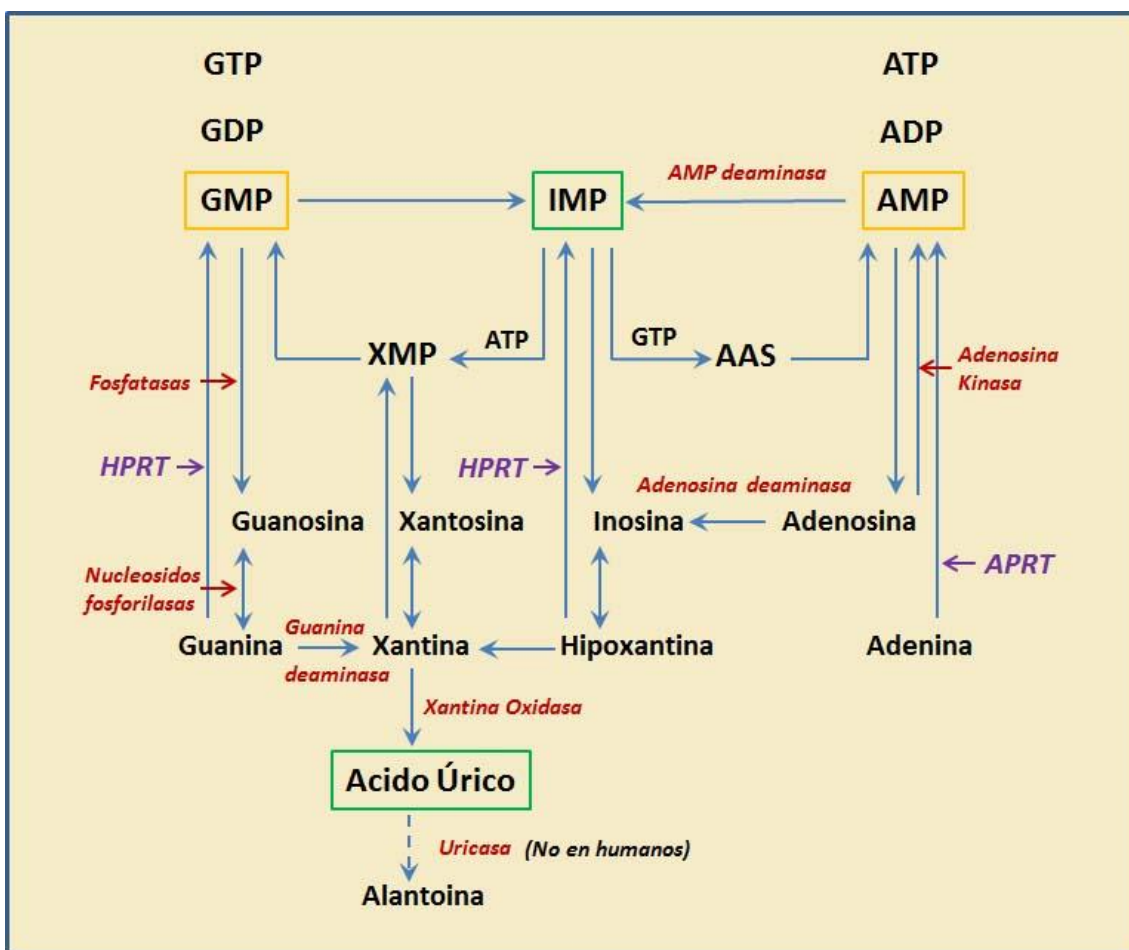


Figura 17.2. Vías de Interconversión (recuadros amarillos) y catabolismo (recuadros verdes) en el metabolismo de Purinas. Adaptado de Scriver, 2001

La interconversión de IMP a AMP y a GMP se realiza a través de vías en dos pasos. Por un lado, el IMP se convierte primero a ácido adenilsuccínico (AAS), utilizando GTP y luego a AMP. La conversión de IMP a GMP ocurre a través del producto intermediario xantósina 5'-monofosfato (XMP), en una reacción en la que el ATP provee la energía para la formación de XMP. Así, cada uno de estas vías de interconversión de nucleótidos depende de la disponibilidad de un producto de la otra. Posteriormente, a partir de AMP, se obtendrán ADP y ATP; mientras que a partir de GMP, se producen GDP y GTP

La enzima *AMP deaminasa* cataliza la deaminación de AMP a IMP con la liberación de amoníaco es una reacción de interconversión de nucleótidos, que junto con los dos pasos para la formación de AMP a partir de IMP constituyen un ciclo de nucleótidos de purina, que es particularmente activo en el músculo.

En los humanos, la **vía catabólica** de las purinas finaliza con la formación de ácido úrico, a través de reacciones de degradación de los nucleósidos de purina 5'-monoP. La defosforilación de AMP, IMP, XMP, y GMP a sus correspondientes ribonucleósidos, con liberación de Pi, es catalizada por *fosfatasa no específicas* y por una *5'-nucleotidasa* específica. Las *nucleósido fosforilasas* de purinas cortan el nucleósido de inosina y de xantósina, a la respectiva base de purina: hipoxantina, guanina y xantina, y ribosa (o d-ribosa)-1-fosfato. Esta reacción es reversible, favoreciendo vía de la síntesis de nucleósidos; sin embargo, frente a un exceso de nucleósidos, la reacción se desplaza hacia la vía catabólica. Por otro lado, el catabolismo de nucleótidos y nucleósidos de adenosina ocurre a través de la deaminación de AMP (a IMP) y de adenosina a inosina, reacción es catalizada por *Adenosina deaminasa*.

Guanina es convertida a Xantina por acción de *Guanina deaminasa*, mientras que la *Xantina oxidasa* produce la oxidación de Hipoxantina a Xantina y Xantina a Acido Úrico (Fig. 17.2). Esta última enzima se expresa solamente en hígado e intestino delgado, y en cantidades de trazas en células endoteliales. La xantina oxidasa es una flavoproteína que contiene Fe y Mo y que existe en formas oxidada (O) y dehidrogenada (D) (Fig. 17.3). En las reacciones de oxidación que llevan a la producción de ácido úrico se generan anión su peróxido y H₂O₂, con posterior conversión de H₂O₂ a radicales hidroxilos libres.

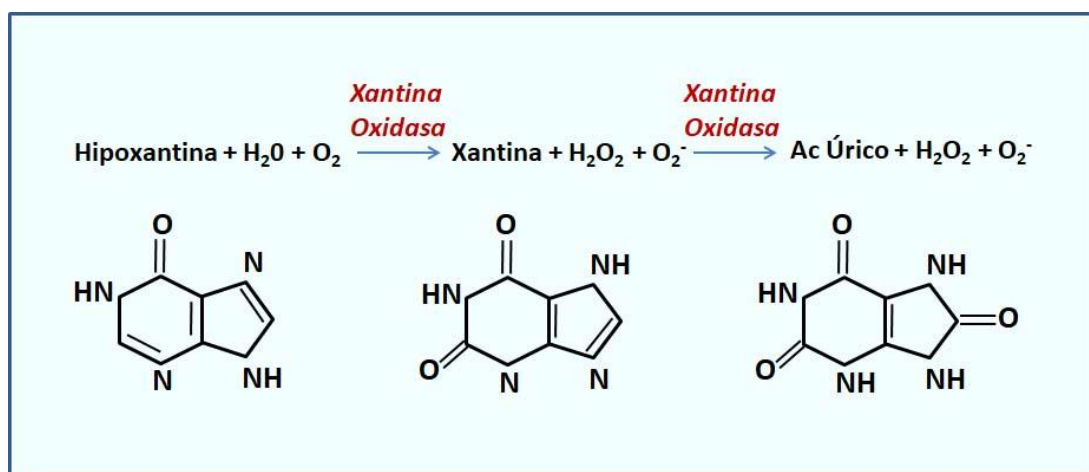


Figura 17.3. Reacción de Xantina oxidasa y estructuras de los diferentes sustratos y productos de reacción

Vías de Reutilización de Purinas

La vía de síntesis *de novo* de purinas requiere 6 ATP para la generación de cada mol de producto nucleótido de purina, de tal manera que resulta ser una vía muy cara para el organismo. Sin embargo existe un vía de reutilización de purinas que es más económica y eficiente para recuperar las bases puricas (Fig. 17.4). Estas reacciones ocurren en un solo paso, a partir de Hipoxantina / Guanina y Adenosina, involucrando respectivamente las enzimas *Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa* (HPRT) y *Adenosina fosforibosil transferasa* (APRT), que catalizan la fosforibosilación de las respectivas bases púricas directamente a los correspondientes nucleótidos por reacciones con PPRP como fuente de fosfato.

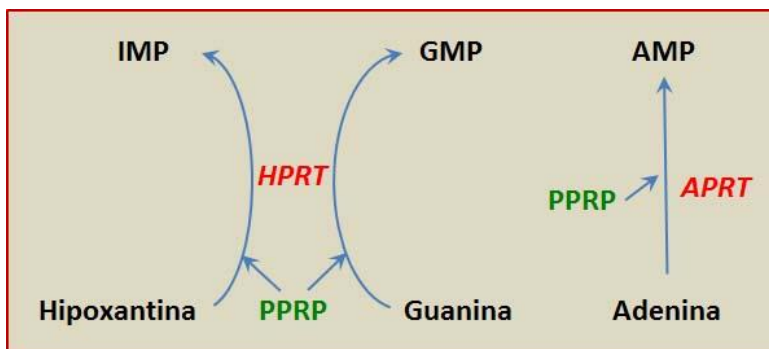


Figura 17.4. Vías de Reutilización de bases Puricas. Hipoxantina, guanina y Adenina son recuperadas en una reacción de un paso catalizada por *Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa* (HPRT) y *Adenosina fosforibosil transferasa* (APRT) usando como fuente de P, fosforibosil pirofosfato (PPRP) derivado de la síntesis *de novo* de purinas.

Por otro lado, la recuperación de inosina y guanosina depende de la conversión catalizada por HPRT de hipoxantina y guanosina derivados de estos nucleósidos en las reacciones catabólicas de nucleósido fosforilasas de purinas. Por el contrario, Adenosina puede ser fosforilada a AMP por *Adenosina quinasa* en una reacción que utiliza ATP como donador de P y que genera ADP. La defosforilación de AMP a Adenosina por *5'-nucleotidasa* y la refosforilación de Adenosina a AMP por *Adenosina quinasa* forman el ciclo de adenosina.

Regulación de la Biosíntesis de Nucleótidos de Purinas

La regulación de la producción de purinas se lleva a cabo a diferentes niveles. En la vía de síntesis *de novo*, la producción de IMP es regulada a través de la primera enzima de la vía, PRS y AMPRT, siendo esta última el paso limitante de la síntesis.

El control de la síntesis *de novo* (Fig. 17.5) que ocurre a nivel de la reacción de la enzima alosterica AMPRT, se lleva a cabo a través de interacciones antagónicas entre PPRP y los productos finales de la vía. La unión de la PPRP a la enzima induce un cambio conformacional que favorece la forma activa de monómero. Los nucleótidos de purinas (en el orden de potencia de monoP, diP, triP), productos finales de la vía, en forma sinérgica inhiben AMPRT, aparentemente por unión a un sitio

distinto de los sitios de unión al sustrato, la cual puede ser sobrepasada por muy altas concentraciones de PPRP. Cualquier aumento en la concentración intracelulares de PPRP estimula la síntesis *de novo* de purinas, y la carencia de este compuesto reduce la velocidad de esta vía. Se sabe que AMPRT puede asumir dos conformaciones: monómeros (133-kDa) que son activos y reversiblemente convertidos a dímeros (272-kDa) inactivos, por adición de productos finales de la vía, nucleótidos inhibidores cuyos efectos son bloqueados por alta concentraciones de PPRP.

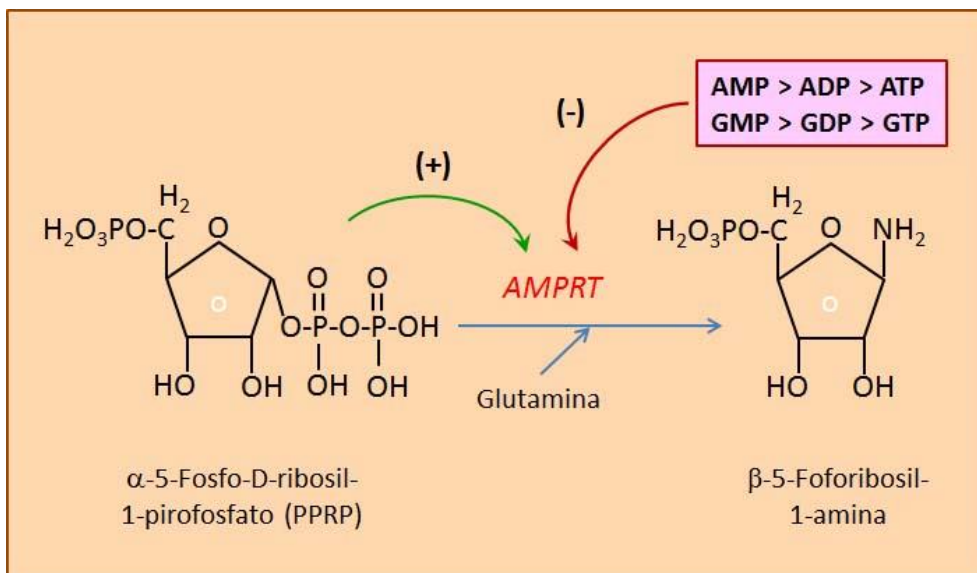


Figura 17.5. Reacción de AMPRT y su regulación alosterica.

Un segundo nivel de regulación en la síntesis *de novo* de purinas ocurre por la acción de nucleótidos de purinas sobre la primer enzima de esta vía, *PPRP sintasa* (PRS). Esta enzima cataliza la síntesis de PPRP a partir de Mg-ATP y Rib-5-P en una reacción que requiere Pi y Mg²⁺ libre (Fig. 17.6).

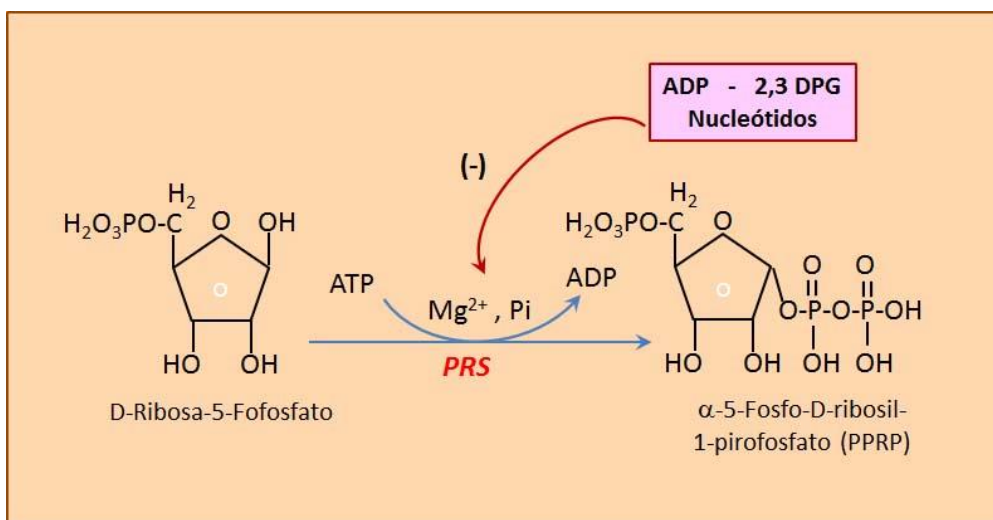


Figura 17.6. Reacción de PRS y su regulación

PRS es una enzima alostérica con tres sitios regulatorios: uno para la inhibición competitiva de ADP con respecto a MgATP; otro para la inhibición competitiva por 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) con respecto a Rib-5-P y uno para la inhibición no competitiva con respecto a ambos substratos por varios nucleótidos de purinas, pirimidinas y piridinas, particularmente nucleósidos diP y triP. La subunidad de la enzima de eritrocitos tiene un peso molecular de 34 kDa y puede sufrir asociación reversible, dependiente de la concentración de la enzima y mediada por efectores, a agregados conteniendo 2, 4, 8, 16 y 32 subunidades, siendo solo enzimáticamente activos los dos últimos multímeros mayores. PRS es menos sensible que la AMPRT a la inhibición por nucleótidos de purinas, su actividad es también inhibida por nucleótidos de pirimidina y piridina, productos de las vías que también requieren PPRP.

Así, la regulación de la síntesis *de novo* de purinas en cada uno de los dos pasos tempranos en la vía asegura el mantenimiento de un control fino y uno grosero sobre los cambios en la disponibilidad de productos finales. El control fino es ejercido por alteraciones en la estructura subunitaria de la AMPRT y la actividad en respuesta a pequeños cambios en las concentraciones de purina, mientras que el control grosero es mantenido por cambios en la actividad de PRS en respuesta a grandes variaciones en las concentraciones de los productos nucleótidos de varias vías biosintéticas.

Controles adicionales en el Metabolismo de Purina.

Las reacciones de interconversión de nucleótidos a partir de IMP para producir AMP o GMP, en dos pasos, son inhibidas por producto final a nivel de la primera reacción: *ácido adenil suxínico sintasa* (AMSS) es inhibida por AMP (así como GDP), mientras que *IMP dehidrogenasa* (IMPDH) es inhibida por GMP. Además, ambas reacciones requieren de los nucleótidos de la otra vía, es decir GTP y ATP, respectivamente, en la síntesis de AMP y GMP, los cuales ejercen con control positivo por encima de la inhibición por producto final. A nivel de la degradación de ribonucleótido, *AMP deaminasa* es activada por ATP y ADP y es inhibida por GTP y Pi.

La Fig. 17.7 presenta un resumen de las vías de síntesis y catabolismo así como su regulación.

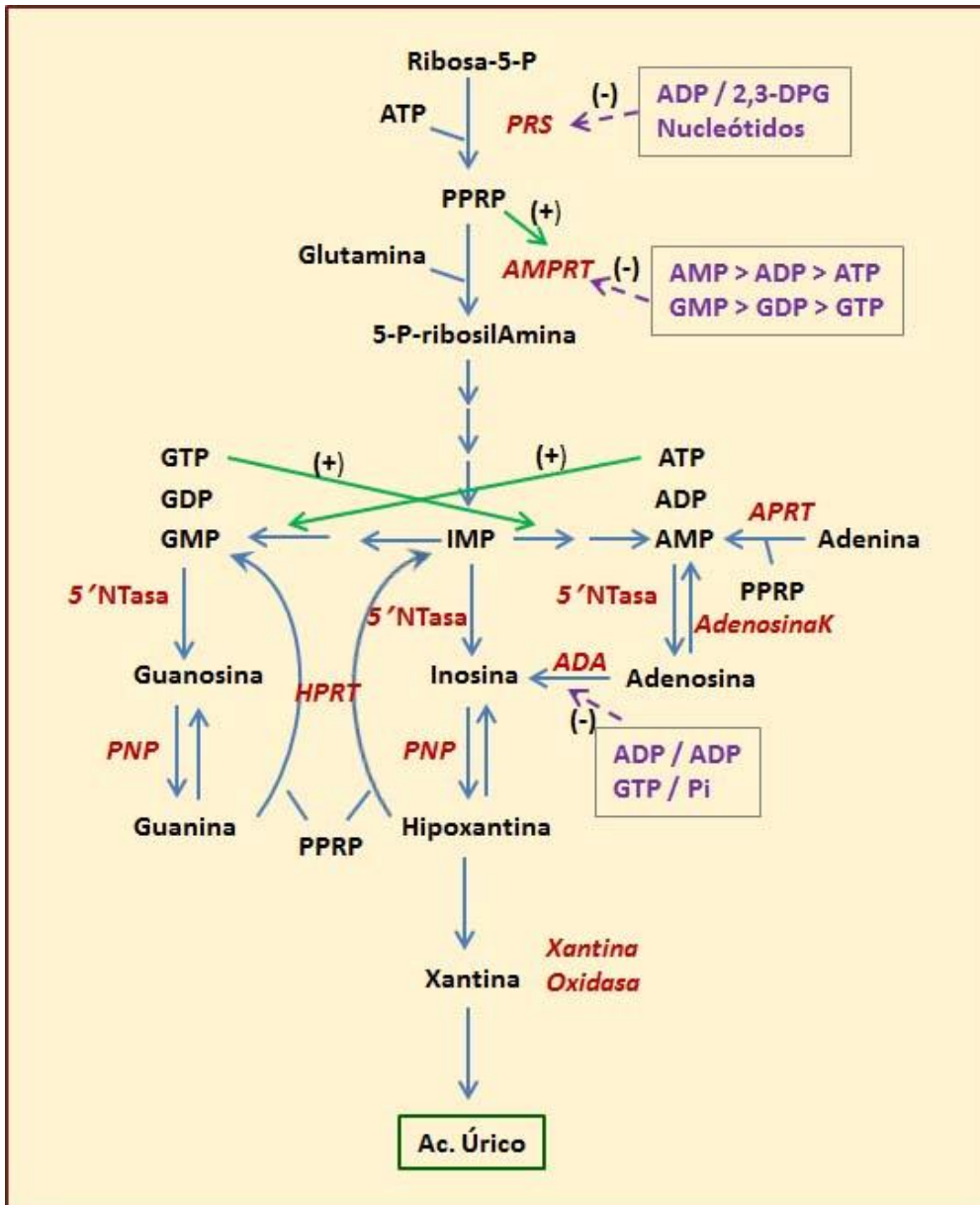


Figura 17.7. Vía de síntesis y catabolismo de purinas y su regulación. Adaptado de Scriver, 2001

Homeostasis del Ácido Úrico

Como ya se mencionó, en los humanos, el producto final del metabolismo de las purinas es el ácido úrico, dado que no tenemos la enzima *uricasa*, que lo convierte en Alantoina, un metabolito rápidamente excretable. La producción y excreción de Ac. Úrico son procesos balanceados, en los que bajo condiciones normales alrededor de 2/3 del Ac. Úrico que se recambia / día se excreta por riñón y el resto se elimina por uricolisis bacteriana intestinal.

El Ac. Úrico es un ácido orgánico débil, una trioxipurina que contiene tres oxígenos en las posiciones 2, 6 y 8 del anillo de purina, ionizado en la posición 9 con un pKa de 5,75 y en la posición 3 con un pKa de 10,3 (Fig. 17.8). De tal forma que a pH fisiológico, este compuesto se encuentra, fundamentalmente, como Urato, que es unas 10 veces más soluble que el ácido úrico.

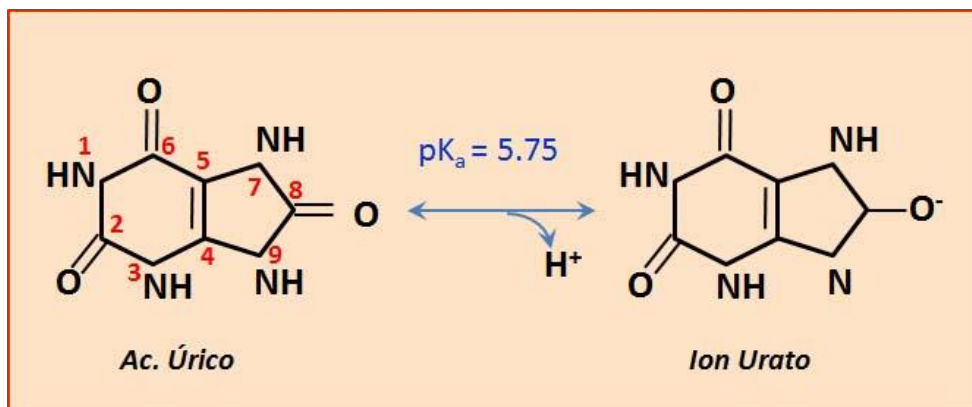


Figura 17.8. Estructura del Ac Úrico y su ionización. Adaptado de Scriver, 2001

Las propiedades de solubilidad del Ac Úrico hacen que en los humanos se desarrollen fluidos sobresaturados, con el riesgo de precipitación de cristales, originando alteraciones en el organismo. El límite teórico de solubilidad para la forma acida mono ionizada del A Úrico, la que predomina en la orina acida normal, y de la forma de urato ionizado (el 98% del A Úrico al pH y [Na⁺] de otros fluidos extracelulares) son limitadas, alrededor de 6.5 mg/dl. De tal manera que en la mayoría de las poblaciones de hombres adultos normales, la [Urato] sérico promedio está muy cerca del límite de solubilidad del urato en suero. Además, en la mayoría de los individuos, la excreción de una orina acida (pH 5.0) se acompaña de concentraciones de Ac Úrico por encima de la saturación a ese pH (15 mg/dl). A pesar de esto, las manifestaciones asociadas con la deposición de uratos son relativamente poco comunes.

El Ac Úrico que principalmente se sintetiza en el hígado pasa a circulación, donde menos del 4% se une a proteínas, de tal manera que está disponible para su filtración renal. Del total de Ac Úrico disponible, el riñón excreta por orina entre 2/3 a 3/4 del mismo. El resto se elimina a través de la uricolisis intestinal, por acción de bacterias intestinales que degradan el Ac Úrico a alantoina y CO₂.

En individuos sanos, el clearance renal de Ac. Úrico es solamente del 7-10% del clearance de creatinina o inulina, lo que significa que hay una reabsorción neta de al menos 90-93% a nivel del nefrona (Fig. 17.9). En el túbulo renal proximal, a través de un proceso facilitado por un transporte activo, ocurre la reabsorción del Ac Úrico. El urato es secretado a nivel del túbulo proximal, a través de un sistema de transporte dependiente de energía que comparte con varios ácidos orgánicos endógenos o derivados de diferentes drogas. Se produce luego una reabsorción post-secretoria y finalmente se excreta alrededor del 10% de Ac Úrico filtrado.

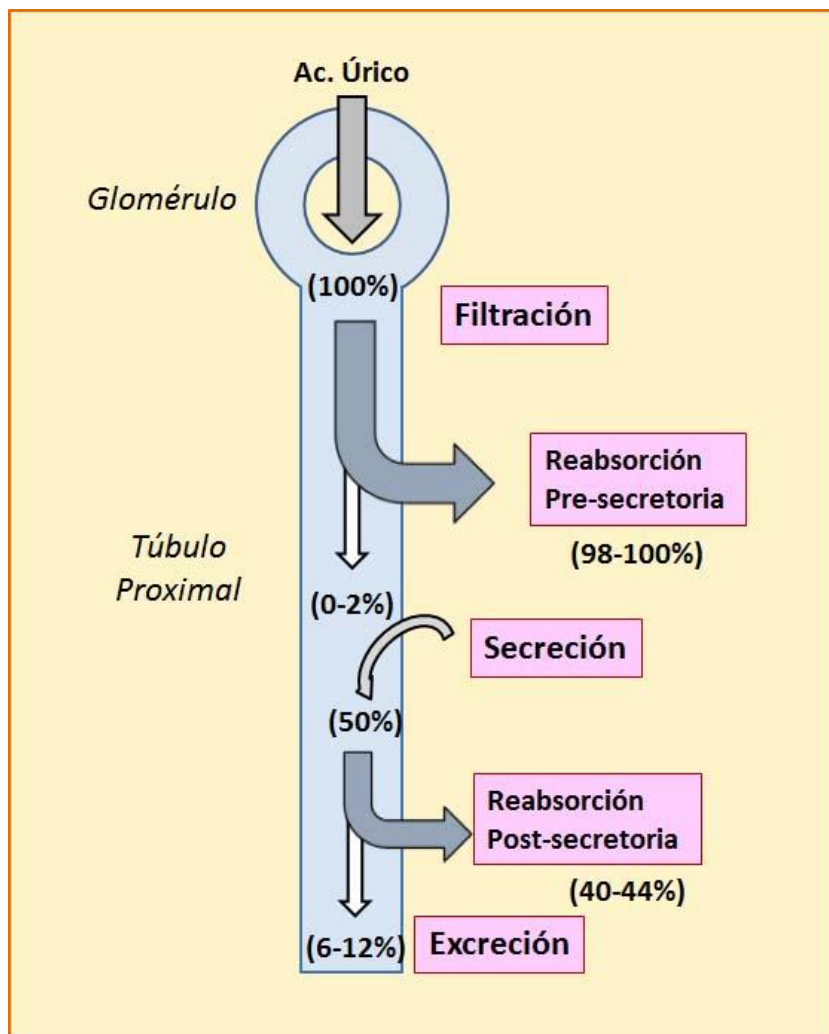


Figura 17.9. Modelo de cuatro componentes para el manejo del Ácido Úrico por el riñón. Adaptado de Scriver 2001.

Alteraciones del Metabolismo de Purinas

Desde un punto de vista clínico, las alteraciones en el metabolismo de purinas se pueden clasificar según el síndrome clínico determinado por el trastorno enzimático o vía metabólica (Tabla 17.1). Algunos de estos síndromes pueden ser adquiridos o congénitos, o eventualmente debidos a determinados fármacos que interfieren en las vías metabólicas.

Tabla 17.1

Síndrome clínico	Alteración	Mecanismo
Hiperuricemia y Gota	Primarias (90%)	- ↑ Producción de Ac. Úrico (10%) - ↓ Excreción de Ac. Úrico (90%)
	Secundarias (10%)	- ↑ Síntesis de Ac. Úrico - ↓ Excreción de Ac. Úrico

Nefrolitiasis	Ac. Úrico Xantina Oxipurinol 2,8-Dhidroxiadenina	- ↑ PPRPS, ↓ HPRT, ↓ G6PDH - ↓ Xantina oxidasa, tratamiento Alopurinol - tratamiento Alopurinol - ↓ AMPRT
Inmunodeficiencias		- ↓ Adenosina deaminasa - ↓ Purina nucleósido fosforilasa
Anemias	Hemolítica Megaloblastica	- ↓ Adenilato ciclasa - ↑ Adenosina deaminasa - ↓ Purina nucleósido fosforilasa - ↑ PRS - ↓ HPRT - ↓ Purina nucleósido fosforilasa
Alteraciones del SNC		- ↑ y ↓ PRS - ↓ HPRT - ↓ Adenilsuccinato liasa - ↓ Adenosina Deaminasa - ↓ Purina nucleósido fosforilasa - ↓ Guanina deaminasa
Miopatías		- ↓ Mioadenilato deaminasa - ↓ Xantina oxidasa - Miopatías metabólicas

Hiperuricemia y Gota

La Gota es una enfermedad por deposición de cristales de urato de sodio en las articulaciones, un síndrome clínico que refleja un grupo heterogéneo de alteraciones genéticas y metabólicas o adquiridas (Tabla 17.1). Las principales manifestaciones clínicas son: Artritis gotosa aguda, tofos, urolitiasis de Ac Úrico y alteraciones renales. Todos los pacientes con gota presentan o presentaron previamente hiperuricemia.

Los cristales de urato monosódico se forman cuando los fluidos corporales están saturados por este compuesto, como consecuencia de:

- Exceso en la producción de Ac. Úrico
- Disminución en la excreción de Ac Úrico
- Combinación de ambos mecanismos

Epidemiología y Etiología

La hiperuricemia se puede definir desde un punto de vista fisicoquímico como: [Urato Na]: 6.5 mg/dl pH 7,40, [Na] 140 mM y 37 °C. Por otro lado, desde un punto de vista poblacional, se ha definido con los siguientes valores:

Hombre adulto: 7 mg/dL

Mujer adulta: 6 mg/dL (pre menopáusica)

Niños: 3-4 mg/dL

La uricemia no es constante a lo largo de la vida, es baja en niños y aumenta en la pubertad en los hombres, pero no en las mujeres, por lo cual se ha definido en forma diferente según la edad y género. Varios factores regulan la concentración de uratos sérica.

La **prevalencia** de hiperuricemia en la población general es de 5-8%, mientras que la prevalencia de Gota es de 2-3:1000. El aumento en el ácido úrico es una condición indispensable para la manifestación clínica de gota, de tal manera que cualquier condición que eleve los niveles de Ac Úrico podría inducir esta condición. La gota e hiperuricemia pueden clasificarse en primarias o secundarias (Tabla 17.1).

La gota primaria (donde se identifica una alteración en la vía metabólica), afecta principalmente al hombre adulto en la 5to o 6ta década de vida y es rara en niño pre púberes y en mujeres pre menopáusicas, probablemente debido a su menor concentración sérica de uratos. Por otro lado, la hiperuricemia y gota secundarias son debidas a otras causas, asociada o no con las vías metabólicas de las purinas. Ambas formas, primarias o secundarias puede deberse a un aumento en la producción de uratos y/o una disminución en su excreción (Tabla 17.2).

Tabla 17.2

	Aumento en producción de Uratos o Biosíntesis de Purinas
Defectos enzimáticos hereditarios	Genéticamente no identificados Deficiencia de HPRT Sobreactividad de PRS Glucogenosis (tipos I, III, V, VIII)
Enfermedades con sobreproducción de purinas o uratos	Desordenes mieloproliferativos (↑ catabolismo Ac. nucleicos) Síndrome Metabólico Malignidades Obesidad Hemólisis Hipoxia tisular Soriasis Síndrome de Down
Condiciones asociadas con drogas o hábitos dietarios	Agentes citolíticos Vitamina B12 (anemia perniciosa) Extracto pancreático Warfarina Fructosa Ac nicotínico Etanol Excesivo consumo de purinas en la dieta

	Disminución en la Excreción renal de Ácido Úrico
Defectos hereditarios en la función glomerular o tubular	No definidos
Enfermedades con disminución en el <i>clearance</i> de uratos	Insuficiencia renal crónica Enfermedad renal poliquística Deshidratación Ayuno Diabetes insípida Acidosis láctica (hipoxia tisular) Obesidad Hiperparatiroidismo Hipotiroidismo Sarcoidosis Eclampsia Envenenamiento con Pb
Condiciones asociados con administración de drogas	Diuréticos Ciclosporina Etanol Pirazinamida Salicilatos (bajas dosis) Etambutol Abuso de laxantes (alcalosis) Levodopa Metoxifurano

Respecto a las situaciones asociadas con aumento en la producción, es claro del conocimiento de las vías metabólicas y su regulación, que todo aquello que lleva a un aumento a acumulación de PPRP, inducirá un aumento en la vía de novo de purinas y consecuentemente al catabolismo y producción de Ac úrico. Es el caso de un aumento genéticamente determinado en la expresión de PRS, o una disminución en HPRT. También bajo condiciones que aumenten el catabolismo de nucleótidos como ocurre en las malignidades, o en condiciones que se asocian con aumento en el consumo o degradación de ATP (síndrome metabólico, excesivo uso de fructosa (bebidas azucaradas) o etanol; o la deficiencia de G-6-Pasa en la glucogenosis tipo 1 (aumento en la producción de ac. urico y disminución en el clearance renal de uratos secundario a la acidemia láctica y cetonemia). Otra situación de hiperuricemia se asocia con la disminución en la regeneración o síntesis de ATP como en la isquemia o hipoxia tisular.

Por otro lado, en el 80% o más de los individuos con gota, **el mecanismo más común** asociado con hiperuricemia es el déficit en la excreción renal de Ac úrico. Cualquier alteración en el manejo renal del Ac. Úrico (Fig. 17.8) puede asociarse con una disminución en su excreción.

Manifestaciones clínicas de la Gota

Los pacientes con hiperuricemia en general son asintomáticos, pero después de 20-30 años de esta condición suelen desarrollar gota sintomática. En general solo el 5% de los pacientes con hiperuricemia llegan a padecer gota.

La gota, enfermedad de depósitos de cristales progresiva y sin tratamiento se manifiesta a través de diferentes estadios:

- Hiperuricemia asintomático
- Artritis gotosa aguda
- Gota Intercritica
- Urolitiasis de ácido Úrico
- Gota tofasea crónica

Artritis gotosa Aguda

Se caracteriza por episodios de artritis inflamatoria dolorosa, con ataques iniciales extremadamente dolorosos, pero que son auto limitados (en 1-2 semanas). En el 80-90% casos son mono articulares, generalmente la primera articulación afectada es la primera articulación metatarso falángica (podagra). Suele haber recurrencia de estos ataques, con episodios poli articulares (ante pié, tobillo, rodilla) con fiebre, leucocitosis aumento en la velocidad de sedimentación. La piel que recubre la articulación inflamada suele hallarse roja y brillante y la resolución de la artritis se acompaña de descamación de piel. Es muy frecuente que estos depósitos aparezcan en las articulaciones y los cartílagos distales, como los dedos o en las orejas, ya que, al tener una menor temperatura, favorecen la precipitación del urato por su menor solubilidad. El pico de incidencia ocurre en hombres entre los 40-60 años, mientras que en las mujeres se manifiesta más tardíamente, entre los 60-80 años.

El **diagnostico** de artritis gotosa, además de cuantificar el urato en suero y orina, requiere del analiza el liquido sinovial. Este liquido se observa con aspecto inflamatorio, recuento leucocitarios de 5.000 – 50.000 / uL, con predominio de neutrófilos. Se puede identificación de cristales de urato monosódico birrefringentes (en forma de agujas) dentro y fuera de los leucocitos, por microscopia de luz polarizada, lo que **confirma el diagnostico** de gota.

Es común observar factores desencadenantes de la artritis aguda: trauma, cirugías, ingestión de alcohol o alimentos ricos en purinas, ayuno, drogas. Otros factores adicionales pueden ser: baja temperatura, contenido de proteo-glicanos, cambios en pH, trauma, envejecimiento, [Urato] local. La artritis gotosa es una sinovitis inducida por cristales de urato, aunque la concentración en sangre, por motivos aún desconocidos, es normal en el 40% de los individuos durante episodios de artritis gotosa aguda. La sobresaturación de Urato en fluido extracelular: necesaria pero no suficiente para inducir la inflamación gotosa aguda.

Patogenia. La presencia de cristales de urato intra-articular, puede ser asintomática por un tiempo, pero eventualmente, los factores precipitante mencionados previamente, ocasionan un procesos inflamatorio (Fig. 17.10). Estos cristales inducen la síntesis y liberación de diversos

mediadores inflamatorios con propiedades quimiotácticas, a partir de proteínas séricas (bradiquinina, calicreína), fagocitos, células sinoviales y otras células. Aumentan las proteasas lisosomales, citoquinas IL-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral $TNF\alpha$. Se produce una activación del endotelio inducida por estas citoquinas, lleva a la migración de neutrófilos al foco inflamatorio, los que van a interactuar con los cristales de urato fagocitándolos e induciendo la liberación de más citoquinas, de tal manera que este proceso perpetua la inflamación, aumentando también la migración de más neutrófilos. A partir de este foco inflamatorio, pueden aparecer en la circulación general IL-1, IL-6, IL-8 y $TNF\alpha$, los que podrían asociarse con síntomas generales como fiebre, leucocitosis, reactantes de fase aguda.

Los cristales de Urato en fagosomas, finalmente se unen a membranas de lisosomas induciendo la lisis de las membranas y aumento en la respuesta inflamatoria por liberación de hidrolasas lisosomales, mediadores de inflamación y aniones superóxido generados por interacción del neutrófilo con el cristal. Esto promueve cambios en la cubierta del cristal, que se recubre de proteínas, determinando la promoción o finalización del procesos inflamatorio. Los cristales de urato pueden existir por largos periodos en las articulaciones sin evidencia de respuesta inflamatoria, debido en parte a las propiedades antiflogísticas de las proteínas adheridas a la superficie del cristal.

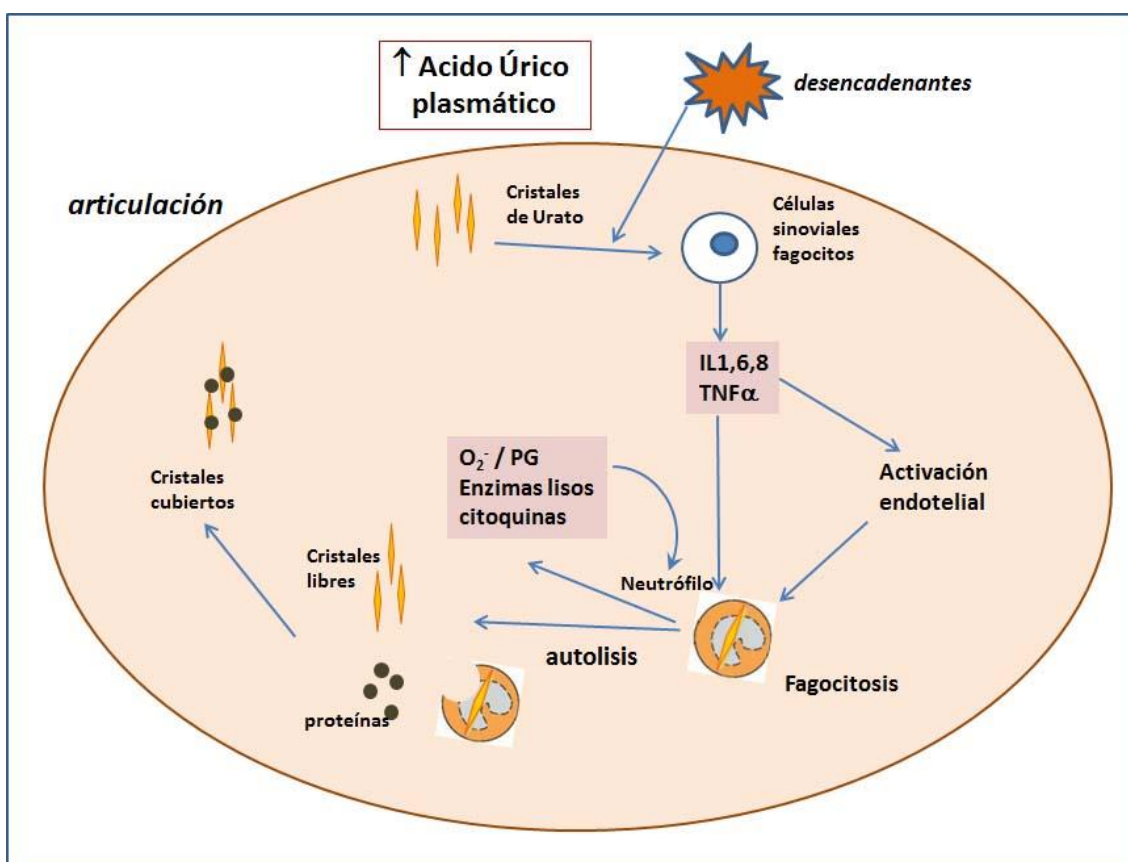


Figura 17.10. Mecanismo patológico en la artritis gotosa. Adaptado de Ghaemi-Oskouie F and Shi Y. 2012

Gota Intercrítica

Se denomina así a los periodos entre ataques gotosos, en los que el individuo permanece asintomático. La mayoría de los pacientes no tratados sufren un segundo ataque de gota entre los 6 y 24 meses del primer episodio. Sin embargo, si se instaura un tratamiento y/o cambio de vida, estos episodios pueden desaparecer; pero a medida que pasa el tiempo, sin tratamiento, la recurrencia de los ataques se hace más frecuente. El diagnóstico de gota puede ser difícil en el periodo intercrítico, a menos que se demuestre la presencia de cristales de urato en articulaciones asintomáticas.

Gota tofácea crónica

Después de varios años sin tratamiento, se observan ataques poliarticulares más prolongados, hasta sin periodos intercríticos, definiendo así un estado de gota poliarticular crónica, que está caracterizado por ataques agudos, secuenciales, con patrón migratorio, o en un cluster de articulaciones adyacentes. Se producen deposición de urato sólido (**Tofos**) en tejido articular y otros tejidos conectivos, causando una reacción inflamatoria crónica que con los años pueden llevar a la atrofia de órganos, deformidades y limitación de la motilidad. Los tofos suelen localizarse en pies, manos, rodillas, codos y pabellones auriculares.

Se conoce que hay varios factores que contribuyen en la progresión de la enfermedad:

- Excesivo consumo del alcohol
- Uso de diuréticos
- Pobre control metabólico
- Pobre comunicación paciente-doctor y/o adherencia a los tratamientos
- Pacientes añosos que recibe diuréticos uricoretentivos y antiinflamatorios, con insuficiencia renal moderada
- Pacientes transplantados y bajo tratamiento con ciclosporina (rechazo de órganos)

Patologías Asociadas

Los pacientes con gota pueden desarrollar diferentes formas de enfermedad renal:

- **Nefropatía de Urato:** deposición de urato monosódico en el intersticio renal (tofos). Aunque esto no es específico de la gota, la falla renal en general se asocia con otras enfermedades, como hipertensión, DM, enfermedad cardíaca isquémica, exposición crónica Pb, antiinflamatorios, insuficiencia renal.
- **Nefropatía de Ac Úrico:** se debe a la deposición de cristales de Ac Úrico desde la orina en el túbulo colector, pelvis renal o uréter. Este cuadro puede asociarse con procesos de alto recambio celular (leucemias, linfomas), o destrucción celular masiva (radioterapia, quimioterapia). La lisis celular lleva alta producción de ac nucleicos que son catabolizados a Ac. Úrico, produciendo el denominado “Síndrome de lisis de tumor agudo”, definido por Hiperuricemia, acidosis láctica, hiperfosfatemia, hipercalemia, hipocalcemia.
- **Litiasis de Ac Úrico:** cálculos de Ac Úrico. Los pacientes con gota primaria presentan una

incidencia 10-25% cálculos renales (mas 1000x población general), mientras que los pacientes con gota secundaria, un 42% incidencia. El riesgo de desarrollar urolitiasis de Ac Úrico en pacientes con artritis gotosa: 1% / año, mientras que en individuos con Hiperuricemicos: 0.27% / año.

Tratamiento

Hiperuricemia Asintomática

- Según el riesgo de un paciente de desarrollar artritis gotosa, tofos, cálculos o nefropatías, será la decisión de iniciar un tratamiento farmacológico. El riesgo, va a depender del grado y duración de hiperuricemia, el sexo y la edad del individuo.
- La terapia anti-hiperuricemica **no se recomiendan como profilaxis**, pero se iniciará ante el descubrimiento de cálculos.
- En caso de individuos asintomáticos, se recomienda iniciar un tratamiento anti-hiperuricemico en 3 situaciones:
 1. Hiperuricemia persistente, niveles urato sérico > 13 mg/dl en hombres y > 10/dl en mujeres (riesgo nefrotóxico, sobreproducción de Ac Úrico)
 2. Excreción de Ac. Úrico urinario diario > 1100 mg (50% riesgo de cálculos de Ac. Úrico)
 3. Pacientes sometidos a radioterapia o quimioterapia (extensa citólisis tumoral): se realiza un tratamiento con alopurinol para prevenir nefropatía de Ac. Úrico aguda.

Artritis Gotosa

En este caso, frente a un paciente con un ataque de artritis agudo, el objetivo es terminar con el dolor y prevenir su recurrencia. Además, se intentará revertir las manifestaciones deletéreas de desórdenes asociados (obesidad, hipertensión, abuso de alcohol, hiperlipemia), en cuyo caso se debe instaurar un tratamiento específico de estas alteraciones.

Manejo de la artritis gotosa aguda se realiza con **anti-inflamatorias** (las drogas anti-inflamatorias no regulan la hiperuricemia y viceversa).

1. Anti-inflamatorios: AINE (no-esteroides) [indometacina, naproxeno, buprofeno, sulindac, piroxicam] y colchicina en forma oral. Los corticoides intra articulares se dan cuando no funciona lo anterior
2. Medidas profiláctica: colchicina oral en bajas dosis, que reduce los ataques recurrentes en pacientes con historia de ataques gotosos; o indometacina, en pacientes con intolerancia a bajas dosis de colchicina
3. Anti-hiperuricemicos:

La restricción dietaria sola disminuye la uricemia 1 mg/dl y por lo tanto no es terapéuticamente efectiva (normalmente es innecesaria, a menos que la función este muy disminuida)

Los Anti-hiperuricémicos (con el objetivo de lograr que la uricemia se mantenga por debajo de su límite de solubilidad, 6.5mg/dl, a largo plazo), actúan sobre la excreción renal de Ac. Úrico o sobre la síntesis de Ac. Úrico.

- Agentes Uricosuricos (Probenecid, sulfipnsona). Aumentan la excreción renal, inhiben la reabsorción tubular. Son Ac. Orgánicos débiles que aumentan el clearance renal de Ac. Úrico. Poseen acciones laterales como urticaria en piel, precipitación de artritis gotosa aguda, intolerancia a la glucosa, cálculos de Ac. Úrico.
- Inhibidores de Xantinaoxidasa: Alopurinol: reduce la síntesis de Ac. Úrico, es un sustrato de Xantina oxidasa, que lo transforma en oxipurinol. Análogos de Hipoxantina y Xantina y aumentan la síntesis de novo de purinas. Posee algunas acciones laterales como la precipitación de artritis gotosa aguda, urticaria en piel, leucopenia, trombocitopenia, diarrea.

Urolitiasis

En caso de cálculos de Ac. Úrico, se debe inducir la alcalinización de orina a pH 6.0 – 6.5 (bicarbonato K oral o citrato K), también se da alopurinol y se debe aumentar el consumo de líquido 2-3 L/día.

En los casos de cálculos de oxalato de Ca e hiperuricosuria, se debe tratar con alopurinol, aumentar la ingesta de líquido y una modesta reducción en purinas dietarias

Nefropatía aguda de Ac. Úrico

Como medidas profilácticas se recomienda disminuir la [Ac. Úrico] y aumentar la solubilidad Ac. Úrico en orina, alcalinizando la orina, mantener alto flujo de orina y tratamiento con alopurinol.

Deficiencia de Hipoxantina Fosforibosil Transferasa (HPRT): Síndrome de Lesch-Nyhan

El síndrome de Lesch-Nyhan ocurre como consecuencia de una deficiencia absoluta en la actividad de HPRT, se hereda como un rasgo X- ligado y está caracterizado por hiperuricemia, movimientos coreoatetoides, espasticidad, hiperreflexia, retardo mental y un comportamiento autoinjurioso compulsivo.

Manifestaciones Clínicas

- **Sobreproducción de ácido úrico.** Todos los pacientes manifiestan tempranamente hiperuricemia, aunque en algunos casos los niveles de Ac. Úrico pueden estar dentro del rango normal debido al gran aclaramiento renal. Se observa hiperuricosuria Ac. Úrico y nefrolitiasis debida a la formación de cálculos en medula renal y otras zonas. Es común la

observación de un sedimento anaranjado en los pañales del niño. También puede haber Tofos, depósitos sólidos de Ac. Úrico en tejido subcutáneo y artritis gotosa, aunque esta última es más común en la edad adulta (2-4ta década), con formas variantes leves.

- **Manifestaciones del neurocomportamiento**, que son indicios de disfunción del sistema nervioso central.
 - *Retraso en el Desarrollo*, (en los primeros 3-9 meses) caracterizados por retardo global sicomotor, hipotonía, y en poco tiempo los niños quedan en silla de ruedas.
 - *Características Extrapiramidales* (al final del 1 er año de vida), con disfunción del ganglio basal: distonia (trastorno del movimiento que causa contracciones involuntarias de los músculos), movimientos coreoatetoides (contracciones musculares involuntarias, impredecibles y rítmicas con movimientos lentos, irregulares y continuos, que ocurre fundamentalmente en dedos y manos) de las manos, balismo (trastorno hiperkinético caracterizado por un movimiento de lanzamiento violento e involuntario de las extremidades).
 - *Características Piramidales* con disfunción del sistema motor corticoespinal: Presentan 3 signos típico, espasticidad (trastorno motor del sistema nervioso en el que algunos músculos se mantienen permanentemente contraídos), hiperreflexia (aumento de los reflejos osteotendinosos) y reflejo plantar extensor. Se observa compromiso de la columna cervical, mielopatía cervical debida a movimientos involuntarios del cuello; así como convulsiones epilépticas, ataxia, disartria, disfagia, que lleva a una inadecuada nutrición, emesis y muerte por neumonía.
 - Alteraciones cognitivas moderadas a severas con retardo mental.
 - Manifestaciones de alteraciones en el Comportamiento hacia padres y cuidadores, con lenguaje inadecuado.
 - Manifestaciones típicas de Auto injuria o automutilación. Suele comenzar alrededor de los 3 años y la presentación más común es la mordedura de labios y dedos
 - Miscelánea: retardo de crecimiento y anemia.
 - Anormalidades hematológicas. Anemia megaloblastica microcitica, Anemia hemolítica, Morfología de plaquetas anormal. El % Linfocitos B, IgG, isohemaglutinina sérica subnormales. La muerte ocurre por infecciones.

Las formas variantes, con defectos parciales en la actividad de HPRT pueden presentarse con diferentes manifestaciones neurológicas. Se hallan asociadas con un aumento en la síntesis de novo de purinas e hiperuricemia, que llevan a nefrolitiasis y artritis gotosa. Según la actividad de HPRT y las manifestaciones clínicas se suele clasificar a los defectos en HPRT en 4 variantes (Tabla 17.3)

Tabla 17.3

Variante	Actividad de HPRT	Manifestación clínica
Lesch Nyhan clásico	0.2 – 1.4% del VN	- Retardo mental - Espasticidad - Coreoatetosis - ↑ producción de Ac. úrico - Automutilación
Lesch Nyhan inteligente	1.4 – 1.6% VN	- Inteligencia normal - Espasticidad - Coreoatetosis - ↑ producción de Ac. úrico - Automutilación
Variante Neurológica	1.6 – 8 % VN	- Sin retardo mental - Espasticidad - Coreoatetosis - ↑ producción de Ac. úrico - Sin Automutilación
Hiperuricemico	8 – 62 % VN	- ↑ producción de Ac. úrico

La **patogenia** de las alteraciones neurológicas es desconocida, aunque se cree que la gravedad de los síntomas neurológicos se relaciona con un defecto en el sistema dopaminérgico de los ganglios basales, pero también estarían implicados otros neurotransmisores como dopamina y adenosina.

El aumento en el Ac Úrico y sus precursores se puede explicar a través de tres mecanismos (Fig. 17.7) asociados con el defecto en la actividad de HPRT:

- Acumulación y excreción de HipoXantina y Guanina, que aumentarían su catabolismo a Ac. Úrico.
- Disminución en IMP y GMP debido a la falta de reutilización de Hipoxantina y Guanina, los que normalmente inhiben la síntesis de novo a nivel de AMPRT. Como consecuencia se pierde parte del feedback negativo sobre esta enzima.
- Aumento de PPRP debido a la falta de consumo en ausencia de HPRT, el cual normalmente estimula la síntesis de novo y como consecuencia se verá activada la enzima reguladora AMPRT.

Genética

Es una enfermedad rara, que en Canadá da cuenta de 1:380.000 nacidos vivos. La enfermedad se hereda en forma X-ligada, por lo que las mujeres carriers son asintomáticas, aunque se han descrito algunos casos de niñas afectadas detectadas genéticamente; mientras que los hombres hemocigotas están afectados y en la forma clásica no se reproducen.

El gene de HPRT se localiza en el brazo largo del cromosoma X (Xq26-q27). Se han descrito más de 500 mutaciones distintas, muy heterogéneas y distribuidas a lo largo de todo el gen.

Diagnostico

Clínico.

- Signos clínicos típicos: disfunción neurológica - Signos de hiperuricemia: cristales de ácido úrico - Comportamiento agresivo

Evaluación bioquímica

- determinación de la actividad de HPRT es confirmatorio (por métodos radioquímicos)
- Muestras: lisado de GR, manchas de sangre seca, fibroblastos de piel, células de folículo piloso, amniocitos, células de vellosidades coriales.

Diagnóstico molecular

- Amplificación por PCR del DNA genómico y secuenciado.

Diagnóstico prenatal

- Ensayo de HPRT o análisis de DNA de extractos de amniocitos en cultivo o vellosidades coriales.

Tratamiento

Métodos físicos. Uso de protección para el paciente

Farmacoterapia. Alopurinol para hiperuricemia

Transplante de medula ósea

Terapia Génica

Referencias

- Ghaemi-Oskouie F and Shi Y. 2012. The Role of Uric Acid as an Endogenous Danger Signal in Immunity and Inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* 2011 April ; 13(2): 160–166.
- Lehninger, AL, 2nd Edition. 1975. *Biochemistry.*
- Sanjurjo P & Baldellou A. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias.* 4ta Edición. Ergon c Arboleda I 2014.
- Scriver CR et al. (Eds). *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* McGraw Hill, 2002. Cap. 106. Hyperuricemia and Gout.

CAPÍTULO 18

Distrofias Musculares

Ana Laura Di Virgilio

Generalidades de las distrofias musculares

Las distrofias musculares son un grupo de desórdenes primarios del músculo, genéticamente determinados y progresivos. Son considerados trastornos severos de desgaste muscular que llevan a la debilidad muscular como manifestación clínica más característica, en los cuales el defecto primario se vuelve más sintomático en el músculo esquelético, con una participación variable del corazón. La degeneración muscular se observa tanto a nivel eléctrico, bioquímico e histológico. La clasificación clínica se ha basado principalmente en la gravedad, la distribución de los músculos afectados y el modo de herencia. El defecto molecular se ha identificado en muchas formas de la enfermedad, y la clasificación clínica está dando paso a una clasificación molecular.

Las distrofias musculares son una amplia clase de trastornos musculares primarios con una amplia gama de etiologías genéticas, presentaciones clínicas e historia natural. La enfermedad generalmente surge a través de una pérdida de función de un producto proteico afectado. Comparten una imagen histopatológica común de la degeneración y regeneración muscular, caracterizada por la necrosis de las fibras, la inflamación y el reemplazo de las fibras musculares de la fibra óptica. Como un grupo, son enfermedades hereditarias muy frecuentes y el patrón de herencia puede ser x- ligado, autosómico dominante o recesivo. Las principales distrofias se listan en la Tabla 18.1.

Tabla 18.1. Clasificación de las distrofias musculares según el modo de herencia

X ligadas
Distrofia Muscular Duchenne Distrofia Muscular Becker Cardiopatía dilatada Distrofia Muscular Emery Dreifuss
Autosómicas recesivas
8 formas de Distrofia muscular "limb girde" (LGMD) Algunas formas de Distrofia muscular oculofaríngea Distrofia muscular congénita Distrofia muscular congénita de Fukuyama
Autosómicas dominantes
3 formas de Distrofia muscular "limb girde" Distrofia facioescapulohumeral Algunas formas de Distrofia muscular oculofaríngea Distrofia miotónica

Las distrofias musculares de Duchenne y Becker (DMD y DMB) son las distrofias musculares clásicas ligadas al X. La DMD y la DMB se distinguieron originalmente en términos clínicos, ya que la DMB tuvo un inicio tardío y una tasa de progresión más lenta. Tradicionalmente, aquellos individuos confinados a una silla de ruedas a la edad de 12 años han sido clasificados como DMD, y los que todavía están ambulantes a la edad de 16 años, como DMB. Entre los 12 y 16 años, son considerados fenotipos intermedios. Dado que ambas enfermedades se deben a mutaciones en el gen de la distrofina, se considera que son variantes alélicas que representan extremos opuestos del espectro clínico del mismo trastorno genético. La distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD) es también ligada al X y es distinta de la DMD y la DMB. Es causada por mutaciones en el gen que codifica emerina y se expresa de manera ubicua, una proteína localizada en la membrana nuclear con una similitud de secuencia con la proteína LAP2 asociada a la lámina nuclear. La fosforilación es crítica para su papel putativo en el anclaje de la membrana nuclear al citoesqueleto.

Varias formas autosómicas recesivas de distrofia muscular, incluidas cuatro de las ocho formas autosómicas recesivas de distrofia muscular de la cintura escapular (LGMD, limb girdle muscular dystrophy) tienen defectos en los cuatro sarcoglicanos específicos del músculo secundarios a mutaciones en los genes correspondientes y ahora se clasifican como sarcoglicanopatías. Otras dos formas de LGMD autosómica recesiva se deben a mutaciones en genes no relacionados con el complejo de distrofina-glicoproteína. Éstos incluyen el gen que codifica la proteasa neutra activada por calcio calpain-3, específica del músculo, y el gen que codifica la disferlina, una proteína de función desconocida relacionada con fer-1 (factor de espermatogénesis de *Caenorhabditis elegans*). La forma clásica de distrofia muscular congénita se debe a mutaciones en el gen que codifica la merosina (laminina-2) en la matriz extracelular, lo que confirma la importancia de la merosina como parte del complejo distrofina-glicoproteína. La distrofia muscular congénita de Fukuyama, común en Japón, se debe a la mutación en un gen que codifica a fukutina, una proteína de función desconocida, que produce una reducción secundaria e inexplicable de merosina en la matriz extracelular, lo que posiblemente explica el fenotipo de la enfermedad.

De las tres formas autosómicas dominantes conocidas de LGMD, se sabe que el defecto molecular en una está en el gen que codifica la caveolina-3, la forma específica del músculo del componente proteico principal de las caveolas en la membrana plasmática. La distrofia muscular fascioescapulohumeral (FSHMD, por sus siglas en inglés) es autosómica dominante y se debe a la eliminación de múltiples copias de una repetición en tándem de 3.2 kb en casos esporádicos y familiares. No se ha identificado ningún gen específicamente alterado en la enfermedad, y las consecuencias moleculares de la eliminación son poco conocidas. La distrofia miotónica es la distrofia muscular más frecuente en la vida adulta. Muestra un patrón característico de debilidad muscular progresiva y desgaste, junto con la miotonía. Involucra el músculo liso y cardíaco, el sistema nervioso central y las glándulas endocrinas, y causa cataratas. Es excepcionalmente variable tanto en la gravedad como en la edad de inicio, ya que la forma congénita grave suele ser mortal en el período neonatal.

Las formas autosómicas dominantes y recesivas de la distrofia muscular oculofaríngea (OPMD) son causadas por mutaciones en el gen que codifica la proteína de unión a poliadenilación 2 (PABP2). La mutación es una expansión de una repetición triplete normal (GCG) 6, que resulta en un estiramiento de polialanina alargado en el extremo N-terminal de la proteína y probablemente un cambio conformacional que induce la formación de filamentos intranucleares característicos. La homocigosidad para un alelo (GCG)7 es responsable de la forma autosómica recesiva, mientras que la heterocigosidad para una expansión más larga explica la forma autosómica dominante. En este capítulo se tratarán las DMD y DMB como ejemplos más importantes de las distrofias X-ligadas, ambas relacionadas a una alteración de la distrofina y la Distrofia Miotónica como ejemplo de las alteraciones autosómicas dominantes.

Distrofina y el complejo glicoproteico

En la figura 18.1 se muestra un esquema del complejo glicoproteico. Los componentes principales son la distrofina y la actina citoesquelética en la cara citoplásmica del sarcolema, proteínas transmembrana que incluyen α , β y sarcoglicanos más α y β distroglicanos, y 2-laminina en la matriz extracelular. La identificación de este complejo y sus componentes proteicos ha sido crucial para comprender las bases moleculares de muchas de las distrofias musculares. El camino del descubrimiento comenzó con la identificación de la distrofina como el defecto molecular en la DMD y la DMB.

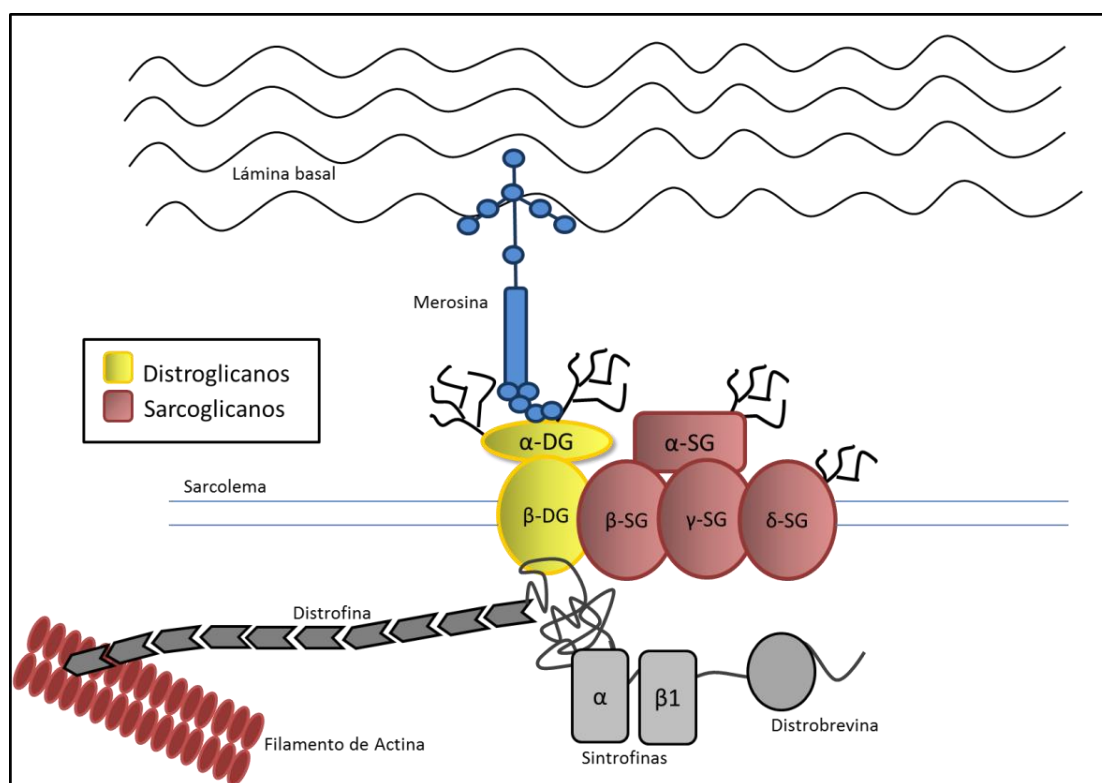


Figura 18.1. Representación esquemática de complejo glicoproteico y sus principales componentes en el sarcolema. Adaptado de Scriver CR (2001).

La isoforma principal de Distrofina, localizadas en el músculo, es una molécula con forma de bastón de aproximadamente 175 nm de largo que contiene cuatro dominios, tres de los cuales también se encuentran en la α -actinina y la β -espectrina. Esta proteína del citoesqueleto se considera un miembro de la superfamilia de las espectrinas. El dominio N-terminal (aminoácidos 14-240) tiene tres sitios de unión a actina y se une a la actina citoesquelética, como se muestra en la Fig. 18.1. El segundo dominio (aminoácidos 278-3080) tiene forma de bastón con 24 repeticiones de una secuencia de 109 aminoácidos similar a las repeticiones encontradas en la actinina y la espectrina. Tiene cuatro "regiones bisagras" ricas en prolina que pueden dar flexibilidad a la barra. El tercer dominio (aminoácidos 3080-3360) es rico en cisteína y también tiene cierta homología con la actina. El dominio C-terminal está altamente conservado en aves, roedores y mamíferos, lo que sugiere un importante papel biológico en la célula.

En el músculo, la distrofina constituye aproximadamente el 5 % de la proteína del citoesqueleto asociada a la membrana. El análisis de Western blot de los extractos musculares con anticuerpos antidistrofina revela una proteína mayor de 400 kDa, y la inmunotinción de las secciones musculares muestra la localización de la distrofina en la membrana sarcolémica de las fibras del músculo esquelético. En el corazón, la distrofina se expresa fuertemente en las fibras de Purkinje.

La distrofina no se limita al músculo. Es muy abundante en el cerebelo, donde se encuentra en el soma y las dendritas, pero no en los axones de las células de Purkinje, y en la corteza cerebral, donde aparece como agregados puntiformes a lo largo del soma y en las dendritas de las neuronas piramidales. En el sistema nervioso periférico, se encuentra una isoforma corta de distrofina a lo largo de la membrana de la célula de Schwann. La isoforma de distrofina de 260 kDa se encuentra en la retina, en la unión sináptica en la capa plexiforme externa. La isoforma de 71 kDa más corta y expresada de forma ubicua también se encuentra en la retina pero en una ubicación diferente, lo que sugiere atributos funcionales diferentes de las isoformas de distrofina incluso dentro de un tejido.

Isoformas de distrofina

La distrofina existe en varias isoformas, generadas por empalme o splicing alternativo o mediante el uso de promotores alternativos, para iniciar la transcripción en diferentes lugares en el gen.

Hay al menos siete isoformas específicas de tejido iniciadas a partir de diferentes promotores (Fig. 18.2 muestra 5 de ellas). Cada uno de los promotores dirige la transcripción del 1er exón a su continuación y cada uno tiene un sitio de comienzo ATG que divide una porción que no se traduce 5' de otra codificante. Se incluyen isoformas específicas de músculo, corteza cerebral, células de Purkinje cerebelosas, cerebro/ riñón, retina, nervio periférico y un séptimo que se expresa de forma ubicua en el hígado y otros tejidos. Los promotores de músculo, cerebro y células de Purkinje están en el extremo 5' del gen, y cada uno tiene su propio exón 1 que se empalma con el exón 2 para generar una isoforma de longitud completa que difiere

de las otras solo en los primeros aminoácidos (P1, P2 y P3 en Fig .18.2). La retina, el cerebro/riñón, el nervio periférico tienen sus promotores en los intrones 29, 44, 55 y 62. De esta manera los primeros exones empalman en los exones 30, 45, 56 y 63, respectivamente, para generar isoformas de 260, 140, 116, y 71 kDa, respectivamente (Las dos últimas se representan como P4 y P5 en Fig .18.2). Estas isoformas cortas carecen del dominio de unión a actina y todo o parte del dominio de la barra y, por lo tanto, se presume que tienen una función algo diferente de las isoformas de longitud completa.

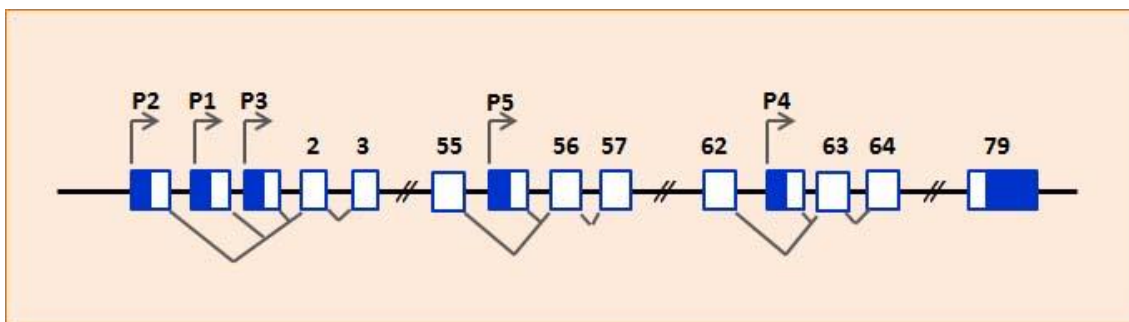


Figura 18.2. Estructura del gen de distrofina mostrando los diferentes promotores. Adaptado de Scriver 2001

El splicing alternativo es más evidente en el extremo 3' del gen y se ha observado en el músculo esquelético, cardíaco y liso, en el cerebro y en la retina. Se ha observado la eliminación de los exones 71 a 74 en varias combinaciones, pero ninguno altera el marco de lectura del mensaje y todos dan como resultado distrofina casi normal. En el músculo esquelético, el ARNm de "longitud completa" es la forma predominante, mientras que las variantes de empalme reducido aparecen con más frecuencia en el corazón. El empalme alternativo para eliminar el exón 78 es más significativo porque altera el marco de lectura del exón 79, reemplazando los últimos 14 aminoácidos hidrofílicos con 32 aminoácidos hidrofóbicos codificados por el marco de lectura alternativo. Este patrón de empalme está regulado a lo largo del desarrollo, con el cambio de la forma hidrofóbica a la hidrofílica durante el desarrollo fetal. Un anticuerpo dirigido contra un péptido sintético codificado por el marco de lectura alternativo también detecta esta isoforma fetal en el músculo liso adulto humano.

Utrofina

El gen de la utrofina en el cromosoma 6 en humano y el cromosoma 10 en ratón codifica un transcrito de 13 kb que muestra una extensa homología con la distrofina, lo que sugiere una derivación de un gen ancestral común. La molécula de utrofina de 395 kDa se expresa en una amplia gama de tejidos fetales y adultos, incluidos el cerebro, el corazón, el hígado, el intestino, el riñón, el intestino y los testículos. La similitud funcional con la distrofina es sugerida por el hallazgo de que la utrofina se une a un complejo de proteínas y glicoproteínas similares a las que se unen a la distrofina.

En el músculo normal, la utrofina se localiza principalmente en la unión neuromuscular en la cresta de los pliegues de la unión. Sin embargo, en la regeneración de las fibras musculares de pacientes con DMD y en pacientes con miopatías inflamatorias, la utrofina se regula y se expresa en todo el sarcolema extrajuncional. Se plantea la hipótesis de que en la DMD esto es un factor atenuante y en un niño con deficiencia de distrofina del que se sospechaba que tenía deficiencia de utrofina, el proceso distrófico fue particularmente rápido.

El complejo glicoproteico

La distrofina se une a la F-actina en su extremo N-terminal, y en el extremo C-terminal está unida a un complejo de proteínas y glicoproteínas de la membrana sarcoplasmática con pesos moleculares de 156, 59, 40, 43, 35 y 25 kDa. Se identificaron dos subcomplejos distintos: el complejo distroglicano y el complejo sarcoglicano.

El complejo de distroglicanos está compuesto de α y β distroglicanos (156 y 43 kDa) derivados del procesamiento proteolítico de una proteína precursora única. La interacción directa entre la distrofina y los distroglicanos se ha demostrado mediante el enlace in vitro y el mapa de sitios de interacción dentro del dominio C-terminal del distroglicano y el dominio rico en cisteína de la distrofina.

El β -distroglicano tiene un dominio transmembrana y se enlaza a α -distroglicano en el lado externo del sarcolema (ver Fig.18.1). Fuera de la fibra muscular, el α -distroglicano está altamente glicosilado y se une a la subunidad 2-laminina de la merosina (laminina-2) en la matriz extracelular. La distrofina desempeña un papel crítico en el ensamblaje o el mantenimiento de todo el complejo en la membrana sarcoplasmática, como lo demuestra el hecho de que tanto los distroglicanos como los sarcoglicanos están ausentes o en una cantidad reducida en la membrana muscular de pacientes con DMD y ratones mdx (modelos animal de deficiencia de distrofina, que tiene un codón de stop en el exón 23).

El complejo sarcoglicano del músculo está compuesto por cuatro glicoproteínas transmembranales, a saber, α , β , γ y δ sarcoglicanos, que son relativamente específicas para el músculo. El recientemente identificado ϵ -sarcoglicano se expresa ubicuamente en muchos tejidos y puede tener una función diferente. Si bien no se sabe que los miembros de este complejo se unan directamente a la distrofina, la distrofina es responsable de su ensamblaje o mantenimiento en el sarcolema, ya que la concentración de sarcoglicano en la membrana se reduce dramáticamente en la DMD y el músculo mdx. Además, tienen una importancia crítica para la función biológica del complejo, ya que se ha demostrado que las mutaciones en los cuatro sarcoglicanos musculares causan distrofia muscular. Todos tienen dominios transmembrana únicos, dominios intracelulares relativamente pequeños y dominios extracelulares grandes. Sus pesos moleculares están dentro de un rango estrecho de 35 a 50 kDa, y todos están glicosilados en al menos un residuo. Todos los sarcoglicanos contienen cinco cisteínas en el dominio extracelular.

La lámina basal alrededor de las fibras musculares es una matriz extracelular especializada compuesta de colágeno, fibronectina, laminina y proteoglicanos. La matriz es una estructura estática que se cree que contribuye a la migración, proliferación y regeneración de mioblastos durante el desarrollo o después de una lesión.

La merosina, o laminina-2, está situado en la lámina basal que rodea el músculo esquelético humano. Se conocen cinco cadenas diferentes, tres cadenas α y dos cadenas β y diferentes combinaciones de cadenas pesadas y ligeras dan lugar a diferentes tipos de laminina. La laminina-2 que rodea las fibras musculares está compuesta por una cadena pesada $\alpha 2$ combinada con $\alpha 1$ o $\alpha 2$ y cadenas ligeras $\beta 1$. La merosina se une directamente a las moléculas específicas de la lámina basal, incluidas la enactina/nidógeno y el proteoglicano de heparán sulfato/perlecano. El β -dístroglicano une la merosina con el complejo de la distrofina-actina.

En la Fig.18.1 también se muestran las sintrofinas (β , $\alpha 1$) que se unen directamente al dominio C-terminal de la distrofina. Estas proteínas, junto con la distrofina, los dístroglicanos y los sarcoglicanos constituyen el núcleo del complejo. La distrobrevina también está estrechamente asociado con las sintrofinas y la distrofina y también puede ser parte de un complejo similar en el que la utrofina reemplaza la distrofina en la unión neuromuscular.

Las funciones de la distrofina y su complejo asociado no se conocen completamente. La distrofina probablemente tiene múltiples funciones fisiológicas que varían según las diferentes isoformas en diferentes tipos de células. El papel funcional de la distrofina en el cerebro y la retina no se ha determinado aún, pero su localización en la membrana sináptica es consistente con una función en la neurotransmisión. En el músculo esquelético, probable el papel principal del complejo es el refuerzo mecánico del sarcolema. El complejo también puede permitir que el sarcolema asuma la configuración normal de plegamiento de modo que pueda permanecer intacto cuando se estiran las fibras musculares. Otra posibilidad es que, dentro del complejo, la distrofina puede servir simplemente como un ancla o estabilizador de los dístroglicanos y sarcoglicanos, lo que refuerza el hecho de que algunas consecuencias de la deficiencia de distrofina pueden reflejar la pérdida de las funciones de los sarcoglicanos. En resumen, la distrofina es un elemento esencial que une filamentos de actina del citoesqueleto con laminina de la matriz extracelular, con lo cual cumple fundamentalmente un rol estructural.

Distrofias Musculares Duchenne (DMD) y Becker (DMB)

La DMD y la DMB son trastornos genéticos recesivos ligados al cromosoma X, clásicos con expresión esencialmente limitada a los hombres. El sello distintivo de estos trastornos es la deficiencia de distrofina determinada genéticamente. La incidencia de DMD es de aproximadamente 28 por 100.000 nacimientos masculinos, mientras que la DMB, una forma más leve, tiene una frecuencia de aproximadamente 5 por 100.000, con una incidencia combinada de 33 en 100.000 o 1 en 3000. La tasa de mutación calculada a partir de las cifras de incidencia es 1 por 10.000 para la DMD, aproximadamente diez veces más alta que para la mayoría de las enfermedades genéticas, sin duda como resultado de la gran diana genética de las mutaciones. La tasa de

mutación es igual en gametos masculinos y femeninos, lo que lleva a la conclusión de que aproximadamente un tercio de los casos de DMD son el resultado de una nueva mutación en la línea germinal de la madre, mientras que dos tercios se heredan de una madre portadora.

Las mujeres que expresan la enfermedad son raras y están relacionadas con la inactivación no aleatoria del cromosoma X. En una portadora típica de DMD, el cromosoma X que porta el alelo normal de DMD está inactivo en aproximadamente el 50 %, lo que proporciona aproximadamente la mitad de la cantidad normal de distrofina. Esto es suficiente para prevenir la necrosis de las fibras musculares siempre que los genes normales se distribuyan de manera uniforme en todas las fibras musculares. La naturaleza aleatoria de la inactivación de X produce una presentación clínica leve en aproximadamente el 8 % de las portadoras de DMD, cuya proporción de células que contienen distrofina está sesgada por debajo del 50 %. La inactivación no aleatoria del X conduce a DMD o DMB en mujeres con translocaciones X-autosoma que interrumpen el gen de la distrofina y al mismo tiempo desencadenan la inactivación no aleatoria del cromosoma X que lleva el alelo normal.

Características clínicas de la DMD y la DMB

La DMD es un trastorno severo de desgaste muscular descrito detalladamente por Duchenne en el siglo XIX. Los varones con DMD son fenotípicamente normales al nacer, y hasta las edades de 3 a 5 años, ni los padres ni el pediatra suelen reconocer ninguna anomalía. Los primeros síntomas incluyen correr lentamente, dificultad para levantarse de una posición sentada y subir escaleras. Inicialmente, los músculos de las pantorrillas muestran hipertrofia con aumento del calibre de la fibra muscular, cuya causa no se conoce. La progresión de la debilidad muscular y la pérdida de la función afectan la capacidad de caminar que puede perderse entre los 9 y 12 años. Las complicaciones incluyen contracturas, particularmente en las extremidades inferiores, y escoliosis torácica que puede agravar la insuficiencia respiratoria. Muchos pacientes requieren cirugía ortopédica para la liberación de contracturas articulares o para la escoliosis. Para la segunda década de vida, la insuficiencia respiratoria puede requerir ventilación, especialmente de noche, y es la principal causa de muerte en la adolescencia. Aquellos que sobreviven a la tercera década con una función pulmonar adecuada a menudo desarrollan una miocardiopatía sintomática. La debilidad muscular en las cinturas pélvicas y escapular, así como en las extremidades inferiores y superiores proximales es responsable de la exagerada lordosis lumbar y la escoliosis toraco-lumbar. Los pacientes utilizan la maniobra de Gower para levantarse desde una posición sentada en el suelo.

La maniobra de Gower se utiliza para explorar en los niños posibles déficit de la musculatura de la cintura pelviana. Consiste en observar cómo pasa el niño de estar sentado en el suelo a la posición de bipedestación. En caso de déficit de la musculatura proximal de las extremidades inferiores el niño necesita apoyarse.

Se observa una reducción media en el coeficiente intelectual (de 20 puntos) en una quinta parte de los pacientes, con una discapacidad mental significativa que se debe a la falta de distrofina en el cerebro.

El fenotipo clínico de la DMB se distingue de la DMD por una edad de inicio más tardía y una tasa de progresión más lenta, con ambulación hasta la edad de 16 años. Aquellos que pierden la capacidad de caminar entre las edades de 12 y 16 años se conocen como valores atípicos, no siendo ni DMD clásico ni DMB. El examen físico en la DMB revela un fenotipo similar a la DMD leve, con una combinación de debilidad axial, andar en puntas de pie e hipertrofia muscular. Posteriormente, la cardiomiopatía dilatada es una característica de la DMB, tal vez relacionada con el estrés en el músculo cardíaco deficiente en distrofina, ya que los pacientes permanecen ambulatorios. Es característico el dolor muscular relacionado con el ejercicio, con frecuencia en la pantorrilla. La deficiencia mental no es un factor en la enfermedad. En raras ocasiones, el inicio de la enfermedad se encuentra en la tercera o cuarta década de la vida, y los pacientes pueden permanecer ambulatorios hasta las edades de 50 a 60 años.

Patología clásica del músculo

En la DMD, la miopatología en una biopsia de músculo es una necrosis de las fibras musculares y la subsiguiente regeneración. Las fibras necróticas en la DMD tienden a aparecer en pequeños grupos de 3 a 10. La regeneración es vigorosa en las primeras etapas de la enfermedad, pero a medida que la enfermedad avanza, la regeneración se vuelve cada vez más inadecuada y produce segmentos de fibra muscular con calibre reducido. Todavía en etapas tempranas de necrosis se puede observar la pérdida de la membrana plasmática y los discos Z, una definición deficiente de miofibrilla, mitocondrias redondeadas con densidades de matriz esponjosa, pero una lámina basal persistente, que se ve como una línea amplia y difusa. Finalmente, en segmentos de fibras musculares necróticas individuales, la regeneración falla, lo que lleva a la pérdida de las fibras musculares y al reemplazo por células adiposas y tejido conectivo. La capacidad de regeneración progresivamente deteriorada de las fibras musculares de DMD puede explicarse por la senescencia de las células satélites después de haber sufrido muchas rondas de proliferación.

Deficiencia de distrofina: la base molecular de DMD y BMD

La inmunohistoquímica de secciones musculares, utilizando anticuerpos antidistrofina es esencialmente negativa en pacientes con DMD mientras que en pacientes con DMB la tinción es "esporádica" o "interrumpida". Una tinción "parcheada", similar a la observada en los músculos de DMB, se observa también en otros trastornos musculares, así como en portadores sintomáticos. El análisis de distrofina en una biopsia muscular obtenida en el útero también es valioso para el diagnóstico prenatal en los casos en que no se conoce la mutación del gen de la distrofina.

Actualmente, se encuentran disponibles comercialmente tres anticuerpos monoclonales para la inmunotinción con distrofina, reconociendo epitopes en la región central, el extremo N terminal y el C-terminal. En la DMB, un anticuerpo dado puede dar resultados completamente negativos

si faltan los epítopes diana de la proteína truncada. Tanto en la DMD como en el músculo de la DMB, se observan pequeños parches de fibras teñidas positivamente, en las cuales se cree que el gen de la distrofina experimenta una segunda mutación para restaurar el marco de lectura. El análisis del ARNm en dichas fibras "revertidas" ha confirmado que en algunos casos al menos una eliminación de un exón adyacente restaura el marco de lectura.

Por Western blot, los pacientes con DMD tienen poca o ninguna distrofina detectable. En contraste, la mayoría de los pacientes con DMB tienen un nivel reducido de distrofina de tamaño anormal debido a la eliminación de un conjunto específico de exones. Esto generalmente resulta en una distribución parcheada de distrofina en la membrana. Con un anticuerpo monoclonal específico y una densitometría cuantitativa, los niveles de distrofina se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, e incluso los pacientes con DMD grave tienen distrofina detectable de peso molecular alterado. Usando anticuerpos contra ambos extremos de la proteína, los pacientes con DMD tienen distrofina anormal que se detecta con el anticuerpo N-terminal pero no con el C-terminal, consistente con una molécula truncada de una mutación que altera el marco de lectura, mientras que los pacientes con DMB tienen distrofina que reacciona con ambos anticuerpos, consistente con una mutación que mantiene el marco de lectura de la traducción.

Bases genéticas de la deficiencia de distrofina

La pérdida de distrofina en la membrana muscular está claramente relacionada con las mutaciones en el gen que codifica la distrofina en la banda p21 en el cromosoma X. La clonación del gen de la distrofina por clonado posicional constituyó la prueba inicial de que las deleciones en la región Xp21 estaban asociadas con la enfermedad. Por análisis de Southern Blot con un conjunto completo de sondas de ADNc, la frecuencia de las deleciones detectables en la DMD se estimó en más del 60 %, y se detectaron duplicaciones en el 6% de los niños afectados. Más recientemente, se han descrito varias mutaciones puntuales.

Las **deleciones** en el gen de la distrofina son heterogéneas con respecto al tamaño y la ubicación. Las más grandes, de varios miles de kilobases de tamaño, eliminan los genes vecinos y se producen en asociación con un síndrome de deleción de genes contiguos. Las deleciones más pequeñas eliminan de uno a unos pocos exones, y su distribución en el gen no es aleatoria. Dos regiones ricas en deleciones son evidentes en el gen, una se extiende sobre los primeros 20 exones y la segunda cerca de la mitad del gen alrededor de los exones 45 a 53. La agrupación de las mutaciones permite detectar la mayoría de las deleciones con un conjunto de reacciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que abarcan los 18 exones eliminados con mayor frecuencia. Estos generalmente se llevan a cabo en dos reacciones de PCR multiplex de 9 exones cada uno.

La gravedad fenotípica no es simplemente una función del tamaño de la eliminación, ya que algunas eliminaciones asociadas con la DMB son mayores y abarcan completamente las eliminaciones asociadas con la DMD. Esto se explica en gran medida por el efecto de la mutación en el marco de

lectura. Una deleción que no altera el marco de lectura genera una proteína que solo carece de aquellos aminoácidos codificados por los exones eliminados. En contraste, una deleción que crea un nuevo marco de lectura después de la eliminación de aminoácidos genera un codón de stop donde finaliza la síntesis de la proteína. La mayoría de las deleciones que producen cambios en el marco de lectura se encuentran en pacientes con DMD, mientras que la mayoría de las deleciones no relacionadas con cambios en el marco de lectura se encuentran en pacientes con DMB. Por lo tanto, esto proporciona un valioso indicador pronóstico, aunque no infalible, de la gravedad de la enfermedad.

Las **duplicaciones** de uno o más exones del gen se puede detectar en aproximadamente el 6 % de los pacientes con DMD mediante Southern blot cuantitativo. Las duplicaciones con cambio de marco ocurren con mayor frecuencia en pacientes con DMD, mientras que las duplicaciones que no cambian el marco de lectura ocurren con mayor frecuencia en la DMB y da como resultado una distrofina aumentada con parte de la secuencia de aminoácidos repetida en la proteína.

Los mecanismos que resultan en la duplicación incluyen tanto la recombinación homóloga como la no homóloga. En los casos en que la duplicación se ha rastreado en familias, la reordenación ocurrió con mayor frecuencia en la línea germinal del abuelo materno, y dado que los hombres tienen un solo cromosoma X, la duplicación debe haber ocurrido por intercambio desigual de cromátidas hermanas.

En un tercio de los pacientes que no tienen deleciones o duplicaciones que abarca varios exones, las mutaciones son difíciles de identificar debido al gran tamaño del gen. Estas **mutaciones puntuales**, se han detectado en muchos pacientes, e incluyen codones de stop, pequeñas deleciones e inserciones que cambian el marco de lectura, señales alteradas de corte y empalme y alteraciones del promotor. Las mutaciones se distribuyen por todo el gen, sin puntos calientes evidentes, y ocurren en casi todos los exones del gen.

Diagnóstico

Antes del desarrollo de las pruebas de diagnóstico molecular, el diagnóstico de DMD se confirmaba principalmente midiendo la CK (creatina kinasa) sérica, la histología muscular y la electromiografía (EMG). La electromiografía es característica, con una reducción en la duración y amplitud de los potenciales de acción de la unidad motora y una mayor frecuencia de los potenciales polifásicos. La electrocardiografía también muestra alteraciones en casos avanzados. El suero CK se eleva de 50 a 100 veces, a expensas de la isoforma muscular. La medición de la CK también es valiosa para la detección de portadores, aunque en las mujeres portadoras el rango de valores se superpone al rango normal, lo que hace que la prueba sea menos que definitiva. En pacientes con DMB, los resultados de laboratorio son similares a los de la DMD, incluida la elevación de la CK y los cambios miopáticos en la EMG.

Por otro lado el análisis molecular se puede realizar a través de un análisis directo del gen o del transcrito por la técnica de Southern Blot con sondas de cDNA a partir de linfocitos de sangre periférica y no se necesita biopsia muscular. El ADN se digiere con la enzima de restricción HindIII. Las

duplicaciones y los carriers son difíciles de diagnosticar con esta técnica. Por otro lado, se puede llevar a cabo mediante PCR, en donde se utilizan pares de primers para amplificar 9 exones que más comúnmente presentan deleciones en los pacientes. Las posiciones de los primers en los intrones adyacentes se eligen cuidadosamente, así cada exón se amplifica en fragmentos de diferentes tamaños en una única reacción y luego se separan por electroforesis. Una variante es la RT-PCR, en donde se amplifican secuencias de cDNA que se obtiene por transcripción reversa del mRNA a partir de sangre periférica, pero resulta muy sofisticada para ensayos de rutina.

Asimismo se puede realizar un análisis de la distrofina, es decir detectar directamente el defecto de la proteína independientemente de la mutación, ya sea por Western Blot o inmunohistoquímica a partir de una biopsia de músculo. La abundancia de la distrofina correlaciona con la severidad de la enfermedad. Se clasifican los pacientes en: DMD (distrofina <3% del normal), DMB severo (e/3 y 10 % del normal), o DMB suave (distrofina > 20% del normal). Cuando se utilizan anticuerpos monoclonales específicos se vio que la cantidad de distrofina era más alta (los pacientes DMD severos mostraron una distrofina de diferente PM en un 25 % del normal).

Diagnóstico para identificar Carriers DMD o DMB

1. Análisis del pedigree: Se puede demostrar el estado de “carrier”, por ej. un hijo y hermano o tío materno afectado, o sugerir el estado carrier (por ej. dos hermanos afectados).
2. Niveles de CK sérica: es un indicador poco confiable debido a un gran solapamiento con los valores normales.
3. Biopsia de músculo: un patrón mosaico de inmunohistoquímica para distrofina o un Western blot cuantitativo que es inconsistente.
4. Si los miembros de la familia afectada tienen una deleción conocida o una duplicación, se puede hacer un análisis de PCR cuantitativo.

Diagnóstico Prenatal de DMD o DMB

- Si se conoce el defecto génico y puede detectarse:
 1. Amniocentesis y análisis de las mutaciones en amniocitos, usualmente por PCR multiplex.
 2. Eritrocitos nucleados fetales de sangre materna para análisis de PCR multiplex.
- Si el defecto génico es desconocido:
 1. Detectar el sexo del feto.
 2. Biopsia del músculo fetal para análisis de distrofina cuantitativa.

Enfoques terapéuticos

Hasta la fecha, se han encarado cuatro enfoques terapéuticos. Lo ideal sería un agente farmacológico que mitigara las consecuencias perjudiciales de la deficiencia de proteínas. El reemplazo de la proteína mutante o ausente por una normal sería una buena opción pero no es muy

realista en el caso de grandes proteínas estructurales, como las implicadas en las distrofias musculares. La regulación positiva de un análogo funcional de la proteína faltante es una opción particularmente atractiva para la DMD dada la existencia del análogo de distrofina. Finalmente, el reemplazo genético, que puede lograrse mediante la transferencia de células miogénicas que llevan un gen normal o mediante la transfección del músculo con un vector que contiene un gen correctivo capaz de producir proteínas funcionales.

- Los **corticosteroides** son los únicos agentes farmacológicos que hasta ahora han demostrado efectos beneficiosos para la DMD. La prednisona ha revelado una mejora significativa en varios parámetros de la función muscular en estudios a largo plazo, pero los efectos secundarios impiden su uso prolongado generalizado. In vivo, la prednisona protege las fibras musculares de rata contra el daño inducido mecánicamente, posiblemente al estabilizar las membranas de fibra muscular. En estudios con ratones mdx, el deflazacort es superior a la prednisona para promover el crecimiento de las fibras y la reparación muscular.

- La **terapia de reemplazo génico** se puede lograr mediante la transferencia de genes mediada por células (terapia celular) o la transferencia de genes mediada por vectores (terapia génica). La terapia génica mediada por células, o terapia celular, consiste en inyectar mioblastos normales en un músculo deficiente en distrofina. Dichos mioblastos pueden fusionarse entre sí y crear fibras musculares nacientes con un contenido de distrofina normal o fusionarse en las fibras musculares existentes del huésped y formar fibras musculares de mosaico en las que hay una corrección parcial de la deficiencia de distrofina. Se encontró que la eficiencia de tal procedimiento en ratones mdx (knock-out para el gen de distrofina) era bastante prometedora, lo que provocó varios ensayos clínicos de fase 1. Los ensayos clínicos de fase 1 en pacientes con DMD fueron decepcionantes, con poca o ninguna expresión de distrofina en el músculo transplantado y solo una mejoría funcional límite en la generación de fuerza del músculo.

En la transferencia de genes mediada por vectores, se crea un casete de expresión de distrofina, que consiste en un ADNc de distrofina truncado o de longitud completa dirigido por un promotor constitutivo o específico del músculo. Este casete se incorpora en un vector adecuado que se inyecta en el músculo deficiente de distrofina, que entrega el transgén en las fibras musculares. En la mayoría de los estudios, el transgén es el cDNA truncado que a menudo se denomina minigen de Becker. Este transgén está diseñado para encajar en vectores con capacidad limitada de ADN y tiene una porción del ADNc de distrofina eliminado para imitar el gen eliminado identificado en un paciente con un fenotipo suave de Becker. El minigén produce una distrofina razonablemente funcional, como se ha demostrado en el modelo de ratones transgénicos mdx, aunque no es tan bueno como un ADNc de distrofina de longitud completa expresado en animales transgénicos.

Hasta la fecha, el adenovirus ha sido el vector de elección debido a su entrega eficiente de su carga genética a un amplio espectro de tipos de células. Los vectores adenovirales de primera

generación son defectuosos en la replicación. Estos virus se probaron primero inyectando directamente en el músculo, pero la expresión fue breve, probablemente debido a una respuesta inflamatoria. La pérdida de actividad transgénica fue particularmente evidente en ratones transfectados más allá del período neonatal, en correlación con el desarrollo del sistema inmunitario, con la pérdida de receptores víricos relacionada con la edad, o con la pérdida de mioblastos que pueden participar en el proceso de transducción viral.

Aunque la inmunosupresión podría mitigar la respuesta antiviral, una mejor solución fue la generación de vectores de adenovirus dependientes de los virus helper. Estos vectores retienen solo los elementos que actúan en la replicación y el empaquetamiento del virus, mientras que los genes que codifican proteínas se han eliminado y las proteínas virales son proporcionadas por un virus auxiliar. Esto aumenta la capacidad de inserción a 28 kb, de modo que el cDNA de distrofina de 14 kb de longitud completa y un gran promotor específico del músculo podría acomodarse.

Como alternativa a la transferencia de genes mediado por vectores in vivo, el suministro de adenovirus de un transgén de distrofina a mioblastos mdx in vitro seguido de la transferencia de los mioblastos al músculo ha dado resultados prometedores. En el futuro, la captación viral puede mejorarse por la ruptura de la lámina basal y manipulando la abundancia de receptores primarios de adenovirus en la superficie celular.

El virus adenoasociado es un vector prometedor para la transferencia génica terapéutica a fibras musculares esqueléticas maduras, que muestra la expresión estable de un transgén lacZ durante más de un año, sin indicación de respuesta inflamatoria o inmunitaria. Es mucho más pequeño que el adenovirus y su absorción en las fibras musculares esqueléticas maduras es muy eficiente. También ha demostrado su capacidad para entregar un transgén al músculo cardíaco a través de una arteria coronaria.

- La **regulación positiva de un análogo funcional** es más atractiva porque podría efectuarse con moléculas pequeñas. El mejor ejemplo de este tipo de estrategia terapéutica es la utrofina, que es altamente homóloga con la distrofina en términos de estructura molecular y se considera un buen sustituto de la distrofina. Aunque ambas moléculas pertenecen a un complejo molecular similar en la membrana, la utrofina se concentra normalmente en la unión neuromuscular y la unión miotendinosa en lugar de a lo largo del sarcolema. En comparación, en ratones mdx que sobre-expresan utrofina de un transgen, el fenotipo distrófico se elimina, lo que implica que la utrofina puede servir como un sustituto funcional de la distrofina. Además, la transferencia del gen de la utrofina mediada por adenovirus en ratones mdx tuvo un efecto mitigador similar en el fenotipo.

Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD)

Es una distrofia muscular ligada al cromosoma X (cuando se asocia al defecto en el gen EMD) y en forma AD o AR si se asocia al defecto en el LMNA. Se caracteriza por contracturas de codo, cuello y columna vertebral, debilidad escápula humeroperoneal y defecto de conducción cardíaca.

Las características clínicas más relevantes son:

- Progreso lento
- Localización más común: escapular o húmero peroneal
- Hipertrofia de pantorrillas: ausente
- Contracturas tempranas en miembros superiores e inferiores
- CK sérica: moderadamente elevada
- Frecuente compromiso cardíaco, con peligro de muerte (defectos en la conducción aurículo ventricular).

Hay dos genes asociados con esta enfermedad: EMD y LMNA. EMD es un gen de 2 kb, 6 exones localizado en el cromosoma Xq28, que codifica para la proteína Emerina que interacciona con Laminina A en la membrana nuclear. Esta proteína se expresa ubicuamente en el organismo, pero predominantemente en el músculo esquelético, corazón, colon, testículos, ovarios y páncreas. El LMNA es un gen localizado en el cromosoma 1q21.2-q21.3 que codifica para dos proteínas, Laminina A y C, ubicadas en la lamina nuclear y que dan soporte estructural al núcleo.

Distrofia Muscular Miotónica (DMM)

La DMM, la más común y variable de las distrofias musculares adultas, ha representado durante mucho tiempo un desafío importante tanto para los clínicos como para los genetistas al intentar explicar su variabilidad clínica y sus características hereditarias inusuales. Estos intentos fueron en gran medida infructuosos hasta que, en 1992, se aisló una mutación específica, dentro de una secuencia de una nueva proteína quinasa, conocida hoy como una expansión inestable de la repetición de trinucleótidos. La prevalencia de la DMM es muy variable, entre 5 – 25 / 100.000 (aproximadamente 1/800). En la Argentina es de 1/10.000.

Características clínicas de la DMM

La distrofia miotónica es uno de los trastornos más variables conocidos, y presenta características que a menudo no son neurológicas. Sin embargo, los síntomas más comunes son neuromusculares, principalmente relacionados con la debilidad muscular y la miotonía, siendo esta última interpretada más comúnmente como rigidez. La distribución de la afectación muscular sigue un patrón característico. Involucra fundamentalmente los músculos faciales superficiales, elevador palpebral superior, temporal, esternocleidomastoideo, músculos distales del antebrazo y dorsiflexores del pie. Otros músculos comúnmente afectados son cuádriceps, diafragma e intercostales, músculos intrínsecos de manos y pies, paladar y músculos faríngeos, lengua, músculos oculares externos. Se puede observar

que los músculos involucrados contrastan notablemente con los involucrados en las distrofias musculares de Duchenne y Becker ligadas al X; La distrofia facioscapulohumeral es la única distrofia autosómica con un patrón similar de afectación del grupo muscular.

La miotonía se reconoce más fácilmente mediante la percusión directa de los músculos (en particular la eminencia tenar) o mediante pruebas de relajación rápida (especialmente de agarre o, con menos frecuencia, cierre del ojo).

Las características extramusculares de la distrofia miotónica son de especial importancia, tanto en el diagnóstico de los familiares en riesgo como en el pronóstico y manejo del individuo afectado. Algunos de estos pueden estar relacionados con una disfunción del músculo liso o cardíaco, u otros sistemas completamente diferentes.

La afectación de los músculos lisos puede manifestarse de diversas maneras, pero la disfunción esofágica puede provocar disfagia y la aspiración bronquial que causa neumonía, mientras que la afectación del esfínter anal y de colon puede producir dolor abdominal, estreñimiento severo y pseudoobstrucción. Los problemas cardiorrespiratorios son la principal causa de muerte en la distrofia miotónica y requieren atención cuidadosa. Se pueden presentar una amplia gama de problemas cardíacos, en particular arritmias, como fibrilación auricular, bloqueo cardíaco y muerte súbita. La anestesia plantea riesgos particulares debido a la combinación de debilidad muscular respiratoria y sensibilidad aumentada a los anestésicos y relajantes musculares.

Entre otras anomalías sistémicas se encuentran las cataratas, que pueden ser la única característica del trastorno y que se caracterizan por opacidades de lentes subcorticales multicolores muy distintivas cuando se ven con la lámpara de hendidura; una variedad de cambios endocrinos de los cuales la atrofia tubular testicular en los varones es más prominente; y diversos grados de afectación del sistema nervioso central que van desde el aumento de la somnolencia, la apatía y las anomalías leves de la personalidad en algunos adultos hasta el retraso mental grave en una proporción de pacientes afectados de forma congénita. Algunos pacientes que presentan estas características sistémicas (especialmente cataratas) pueden tener una mínima o, ocasionalmente, ninguna anomalía muscular detectable.

La distrofia miotónica congénita fue reconocida por primera vez por Vanier en 1960 y desde entonces ha quedado claro que se trata de una forma distintiva, a menudo fatal y muy poco frecuente de distrofia miotónica. Se ve casi exclusivamente en la descendencia de mujeres que están afectadas. Las principales características de la distrofia miotónica congénita vienen dadas por una apariencia facial que es muy distintiva, en gran parte debido a la combinación de parálisis facial bilateral con debilidad marcada de la mandíbula. Durante el desarrollo intrauterino, la debilidad muscular ayuda a moldear las características craneofaciales al crear el característico labio superior en forma “de carpa” y otras características dismórficas. La disminución de la acción muscular intrauterina desempeña un papel en muchas de las otras características, como la alta incidencia de insuficiencia respiratoria e hipoplasia pulmonar (causada por un diafragma poco desarrollado y músculos intercostales), la aparición de talipes y otras contracturas articulares, el desarrollo de polihidramnios (debido a la falta de deglución intrauterina), y los movimientos fetales generalmente

pobres. En contraste con el trastorno adulto, la miotonía está ausente en los bebés afectados, aunque se vuelve más prominente a medida que los individuos afectados llegan a la infancia tardía.

Base genética y mutaciones

La base genética de la DMM resulta de la expansión de una secuencia de repetición de trinucleótidos inestable (mecanismo similar al que ocurre en el Síndrome de X-Fragil, Cap. 5).

La secuencia inestable fue detectada a través de un ensayo en el cual el ADN genómico digerido con EcoRI muestra un patrón de bandas polimórfico (Fig. 18.3). El patrón normal es un polimorfismo de inserción /eliminación de dos alelos con bandas de 9 y 10 kb, siendo individuos heterocigotos (banda de 9 kb y 10 kb) u homocigotos para una u otra banda (banda de 9 kb o 10 kb). En la distrofia miotónica, se ve un alelo normal, pero el otro aumenta de tamaño a un grado variable. Todos los individuos tienen una banda constante de 15 kb. El grado de aumento observado en estos estudios iniciales varió desde un adicional de 150 pb hasta 6 kb de ADN adicional. Lo más importante es que esta variación se observó dentro de familias individuales, en particular entre generaciones. Se puede apreciar (Fig. 18.1), que la expansión de la secuencia en generaciones sucesivas concuerda con la observación clínica de la anticipación y con la estabilidad genética esperada de una secuencia de repetición de trinucleótidos expandida.

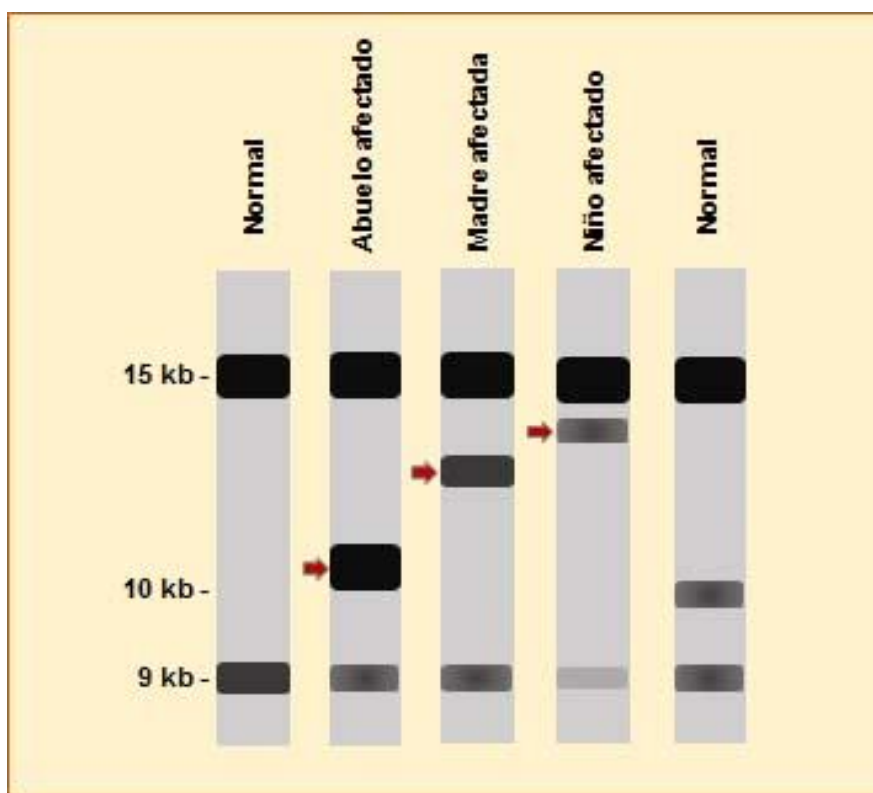


Figura 18.3. Esquema que representa un Southern blot obtenido por digestión con EcoRI mostrando las bandas de 9 y 10 kb correspondiente a individuos normales homo o heterocigotas y a individuos afectados en tres generaciones de una familia. La flecha roja indica la banda correspondiente a expansiones leves, moderadas y severas del triplete CTG en el abuelo, madre y niño afectados, respectivamente. Adaptado de Scriver, 2001

La confirmación del defecto mutacional en la distrofia miotónica como una expansión de repetición de trinucleótidos tuvo que esperar el aislamiento del gen, un evento que ocurrió pocos meses después de la identificación de la secuencia inestable. La mutación encontrada es una repetición de CTG que se encuentra en la región no traducida 3' del gen que ahora se conoce como la proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK).

Se pudieron identificar una serie de características genéticas inusuales tales como la herencia autosómica dominante, pero con una variación extrema en la expresión a pesar de la falta de heterogeneidad genética; la extrema variabilidad del trastorno dentro de las familias individuales; los efectos de origen parental en la transmisión de la enfermedad, en particular la transmisión materna de la distrofia miotónica congénita; y, más notablemente, el fenómeno de la anticipación, es decir que existe una progresión de la enfermedad en generaciones sucesivas en cuanto a edad de inicio y severidad.

La anticipación tiene un lugar especial en la genética de la distrofia miotónica. No solo fue el primer trastorno por el cual se demostró sobre la base de evidencia clínica válida, sino que siempre ha sido el ejemplo más claro del fenómeno y ahora se reconoce como un indicador valioso de una posible expansión de la repetición de los trinucleótidos.

Los estudios iniciales que identificaron la repetición de CTG inestable en la distrofia miotónica identificaron de inmediato su naturaleza variable dentro de las familias, la relación con la anticipación y una asociación aproximada entre el grado de gravedad y el tamaño de la secuencia ampliada. Desde entonces, numerosos estudios adicionales han explorado hasta qué punto se correlacionan el genotipo y el fenotipo, en términos de la gravedad general de la enfermedad y la edad de inicio, y también en relación con los sistemas específicos clínicamente involucrados.

Las principales categorías clínicas utilizadas han sido la distrofia miotónica congénita; enfermedad de inicio en la infancia; forma clásica con inicio en adulto; y enfermedad mínima (a menudo solo cataratas) en la vida posterior. Claramente, estas agrupaciones están fuertemente relacionadas con la edad, y la edad de inicio se ha utilizado como un indicador, lo que tiene la ventaja de ser cuantificable aunque sea aproximado.

Existen diferencias claras, aunque superpuestas, en el tamaño de expansión para los diferentes grupos estudiados. Todos los casos congénitos mostraron expansiones de 2500 pares de bases o más, mientras que en el grupo mínimamente afectado todas las expansiones fueron de 250 pares de bases o menos, lo que dio una separación completa de estos dos grupos extremos. Los casos con enfermedad adulta típica mostraron una amplia variación del tamaño de expansión, superponiéndose con los otros grupos. Asimismo, para la edad de inicio, se encontró una fuerte correlación inversa con el tamaño de expansión pero no se encontró ninguna diferencia de sexo.

Diagnóstico

Ahora que las pruebas moleculares están ampliamente disponibles, las pruebas preclínicas previamente utilizadas, como la electromiografía o la detección de opacidades de lentes han quedado en desuso. La evaluación clínica cuidadosa ciertamente sigue siendo importante y, con

frecuencia, mostrará anomalías claras en las personas que no tienen síntomas; una evaluación clínica normal también es importante, ya que permitirá a aquellos en quienes se encuentra una anomalía genética, tener la seguridad de que su estado de salud actual es normal.

La identificación de una mutación específica ha tenido importantes aplicaciones en la práctica clínica. Se pueden identificar dos áreas de aplicación amplias: primero, la de la predicción para los familiares en riesgo, ya sea confirmando o excluyendo la presencia de la mutación; segundo, el uso del análisis molecular como parte del diagnóstico primario, generalmente en ausencia de un historial familiar claro del trastorno.

Para los familiares sanos en riesgo de distrofia miotónica, un análisis molecular normal esencialmente excluye el riesgo de desarrollar o transmitir el trastorno, aunque siempre es aconsejable asegurarse de que la mutación esté presente en el familiar más cercano afectado, de manera que se excluya la posibilidad de un diagnóstico erróneo. Un uso particularmente valioso del análisis molecular es para aquellos familiares en los que se han detectado características clínicas equívocas o atípicas en la evaluación clínica o en estudios electrofisiológicos u oftalmológicos. La gran variabilidad del trastorno hace que esta situación sea relativamente frecuente. El análisis molecular resolverá la situación, pero debe manejarse con cuidado, especialmente en situaciones en las que una persona puede haber tomado decisiones importantes durante muchos años sobre la base de creer que portaban el gen de la distrofia miotónica y que probablemente desarrollarían o transmitirían el trastorno. La identificación de la mutación en abuelos asintomáticos o mínimamente afectados u otros miembros de la generación de mayor edad puede ser valiosa para vincular a familias aparentemente desconectadas o para decidir qué línea familiar está en riesgo.

El diagnóstico molecular primario ha demostrado ser valioso en el diagnóstico diferencial de trastornos neuromusculares en adultos y en la confirmación o exclusión de la distrofia miotónica como la causa de cataratas. En la infancia, la distinción de otras miopatías congénitas también ha demostrado ser valiosa.

Métodos moleculares. La estimación del número de repetición basada en PCR es ahora el enfoque estándar, especialmente para detectar expansiones de tamaño pequeño a moderado. Sin embargo, el tamaño muy grande de algunas expansiones observadas en la distrofia miotónica puede dar como resultado un fallo en la amplificación, y solo se detecta el alelo normal. Este problema es particularmente crucial en el diagnóstico prenatal, que suele hacerse cuando es probable que se presente un caso congénito con una expansión muy grande. El Southern Blot sigue siendo una parte esencial del protocolo aquí, aunque se informaron métodos basados en PCR especialmente adaptados, capaces de detectar expansiones de trinucleótidos de todos los tamaños, que probablemente reemplacen a la técnica de Southern blot.

Diagnóstico prenatal. La posibilidad de un diagnóstico molecular directo en el embarazo temprano ha demostrado ser un gran avance. El diagnóstico prenatal es especialmente solicitado por aquellas parejas en las que un niño anterior falleció o está gravemente afectado por la distrofia miotónica congénita. En tales familias, el riesgo de un niño más gravemente afectado

tado es alto, y el diagnóstico prenatal, generalmente mediante muestreo de vellosidades coriales, proporciona un método preciso para detectar o excluir un embarazo afectado. Estos casos casi siempre están asociados con expansiones extremadamente grandes de varios miles de repeticiones, aunque no es posible una correlación precisa entre el número de repeticiones y la gravedad clínica.

Tratamiento

Actualmente todavía no hay una terapia comprobada que altere el curso natural de la distrofia miotónica. Se han llevado a cabo varios ensayos controlados, pero solo uno proporciona resultados preliminares alentadores, como el factor de crecimiento similar a la insulina (rhIGF-1), que muestra un aumento de la síntesis de proteínas y una mejoría clínica en un pequeño subconjunto de pacientes.

Por lo tanto, lo más importante es una administración general cuidadosa para garantizar que tanto los pacientes como los médicos estén plenamente conscientes de las numerosas complicaciones potenciales. Los problemas incluyen los peligros de la anestesia y la cirugía y las precauciones necesarias para evitarlos; el riesgo de arritmias cardíacas; aspiración bronquial por disfunción esofágica y dilatación colónica. Las medidas positivas que dan buenos resultados son la cirugía para cataratas y los procedimientos ortopédicos correctivos en la infancia.

Quizás la medida más útil de todas es que los pacientes reciban atención médica continua y supervisión de un equipo clínico que tenga experiencia e interés en la distrofia miotónica en sus diferentes aspectos y que los propios pacientes estén completamente informados sobre los diversos aspectos del manejo y los posibles problemas que puedan surgir.

Referencias

ADAM. Asociación distrofia muscular para las enfermedades neuromusculares. <https://www.adm.org.ar>. Scriver CR .(Eds). The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw-Hill, 8 ed. 2001. Chapter 216: The Muscular Dystrophies. Autores: Ronald G. Worton, Maria Judit Molnar, Bernard Brais, George Karpati. Chapter 217: Myotonic Dystrophy. Autores: S. Harper Peter, Johnson Keith.

CAPÍTULO 19

Hiperfenilalaninemias - Fenilcetonuria

Ana M. Cortizo

Introducción

Hiperfenilalaninemias (HPA) son una serie de condiciones caracterizadas por aumento persistente en la concentración plasmática de Phe, debidas a alteraciones en la hidroxilación hepática de este aminoácido. En esta vía (Fig. 19.1), la Phe es hidroxilada a Tyr por acción de *fenilalanina hidroxilasa* (PAH) hepática y la coenzima tetrahidrobiopterina (BH₄), la cual se reduce a la forma quinonoide (qBH₂) en la reacción de hidroxilación. Asu vez, la qBH₂ debe ser regenerada por acción de la enzima *dihidropterina reductasa* (DHPR). Cualquier defecto en estas vías, involucradas en la homeostasis de Phe, causara un aumento en la [Phe] circulante. La principal causa de hiperfenilalaninemias es el defecto en la PAH (98% de los casos), el resto de los casos (2%) debidos a defectos en la síntesis o reciclaje de BH₄ deben considerar en el contexto del diagnóstico diferencial de las hiperfenilalaninemias, ya que su tratamiento y pronósticos son diferentes.

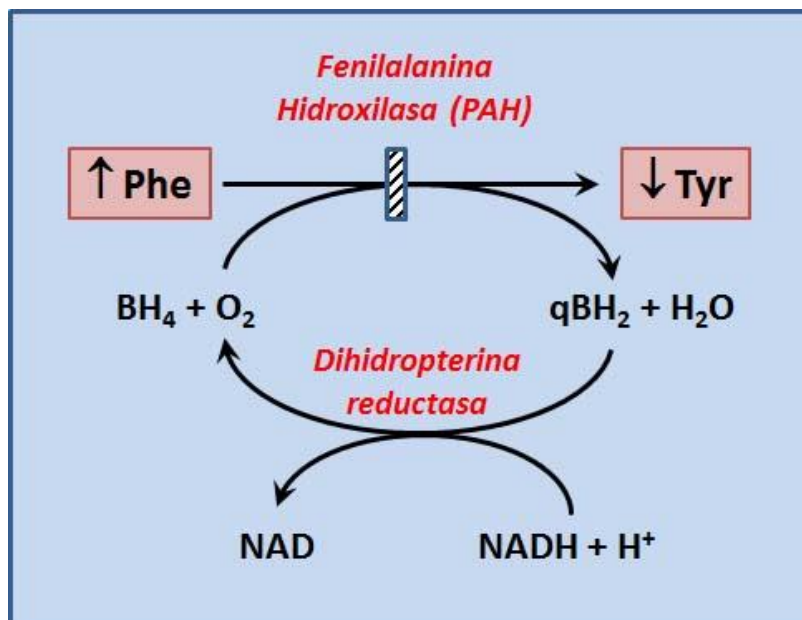


Figura 19.1. Vías metabólicas de la Phe. Frente a un bloqueo de la vía / inhibición de PAH (fenilalanina hidroxilasa), se produce acumulación de Phe y caída en la producción de Tyr. Adaptado de Sanjurjo, 2014.

Fenilcetonuria (PKU)

La PKU es una enfermedad congénita del metabolismo de Phe debida a la deficiencia de PAH o la deficiencia del cofactor BH₄, que lleva a altos niveles plasmáticos de Phe. Se caracteriza por ausencia de síntomas específicos en el periodo neonatal y el principal signo clínico es el retraso mental. El tratamiento precoz por restricción dietaria de Phe es efectivo y evita el retraso mental. Esta enfermedad se hereda con un patrón AR y presenta una prevalencia de 1:10,000 nacidos vivos. En Latinoamérica varía entre 1:50,000 a 1:25.000 nacidos, siendo más alta en los países latinoamericanos del sur que en otras regiones, y en la Argentina de 1:27,000.

Historia

Esta enfermedad fue descrita primero por Asbjørn Følling (1934), en dos hermanos con retraso mental y un olor característico. La orina de estos pacientes adquiría un color verde oscuro al añadirle cloruro férrico (usado para determinar cuerpos cetónicos) y dedujo que se debía a la presencia de Ac. Fenil pirúvico. Estudios en otros pacientes en tres familias llevaron a concluir que se trataba de una enfermedad de retraso mental asociada con un error congénito del metabolismo. Følling observó la herencia AR e identificó a la Phe como el metabolito que se acumulaba y era precursor del Ac. Fenil pirúvico.

En 1953 se demostró el defecto en la PAH y Host Bickel (1953) demostró la posibilidad de un tratamiento por restricción dietaria de Phe. Posteriormente, Robert Guthrie (1963) desarrolla el método de detección de Phe en sangre, y que permitió prevenir el retraso mental en el periodo neonatal. Se aisló el Ac fenilpirúvico (determinado con Cl₃Fe); en institutos de chicos discapacitados encuentran 8 individuos con Ac fenil pirúvico (+) y en familiares (dos hermanos)

Ac fenil acético se detectó con el caso de un odontólogo asmático, que expresaba crisis asmáticas cuando estaba en una habitación cerrada con sus hijos afectados.

En 1983, Woo localizó el gen para PAH en el cromosoma 12q24.1, el que fue clonado y hasta hoy se han detectado más de 400 mutaciones. En 1998 Scriver crea una base de datos que incluye datos de la clínica, genética, investigación básica y otros aspectos de la PKU (www.pahdb.mcgill.ca).

Bioquímica de Phe

La Phe es un aminoácido esencial que se incorpora con las proteínas dietarias (de la leche) (Fig. 19.2). También es provista desde un pool endógeno, derivado del aminoácido libre y el unido a proteínas. El recambio involucra la incorporación a este pool de unión, la oxidación a Tyr (catalizada por PAH en el hígado), y su conversión a metabolitos menores a través de reacciones de transaminación y descarboxilación. Una parte de la Phe es usada para la síntesis de proteínas, pero esto depende principalmente del estado fisiológico y edad del individuo. Por ej., en los niños en crecimiento es mayor, igual que durante el embarazo. Los valores normales de Phe en sangre < 2.0 mg/dL (120 μmol/L) {1mg/dL ≅ 60 μmol/L}

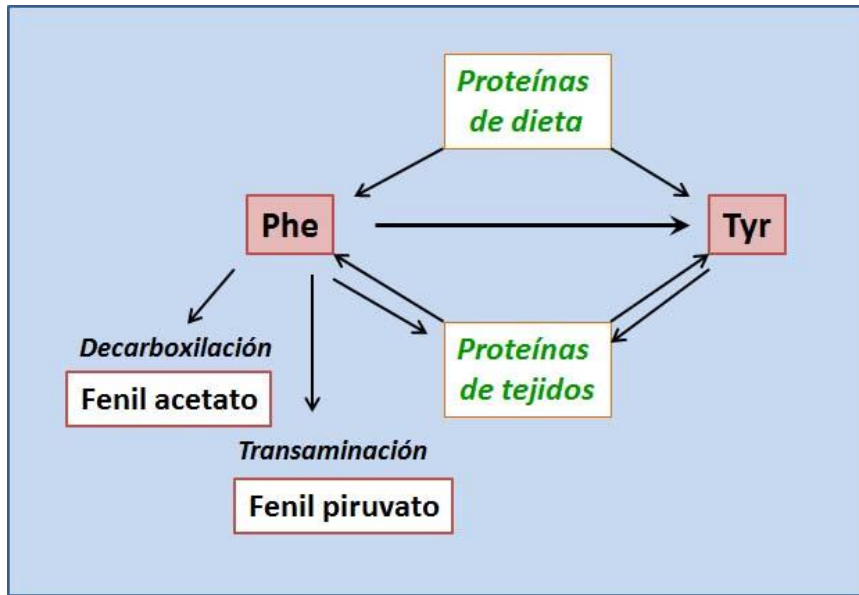


Figura 19.2. Ruta principal de la Phe. Proviene de la dieta y del recambio del pool endógeno

La PAH necesita de 3 factores: BH₄, O₂ molecular y NADH. Esta enzima es un tetrámero con 3 dominios, hay un dominio catalítico donde se une el Fe que capta 2 e⁻ a partir de BH₄ (dador de e⁻). Por su parte BH₄ se sintetiza de novo a partir de GTP, en una vía que incluye tres pasos enzimáticos. Cualquier defecto en alguna de estas enzimas llevara a un déficit en los niveles de BH₄ y consecuentemente en el metabolismo de Phe. Los defectos en estas enzimas son mucho menos frecuentes que el déficit de PAH. El cofactor BH₄ interviene en otras reacciones, por ej., a partir de Tyr se producen diferentes neurotransmisores (Dopa, serotonina), citrulina y óxido nítrico (NO) por acción de *óxido nítrico sintasa* (NOS) (Fig. 19.3).

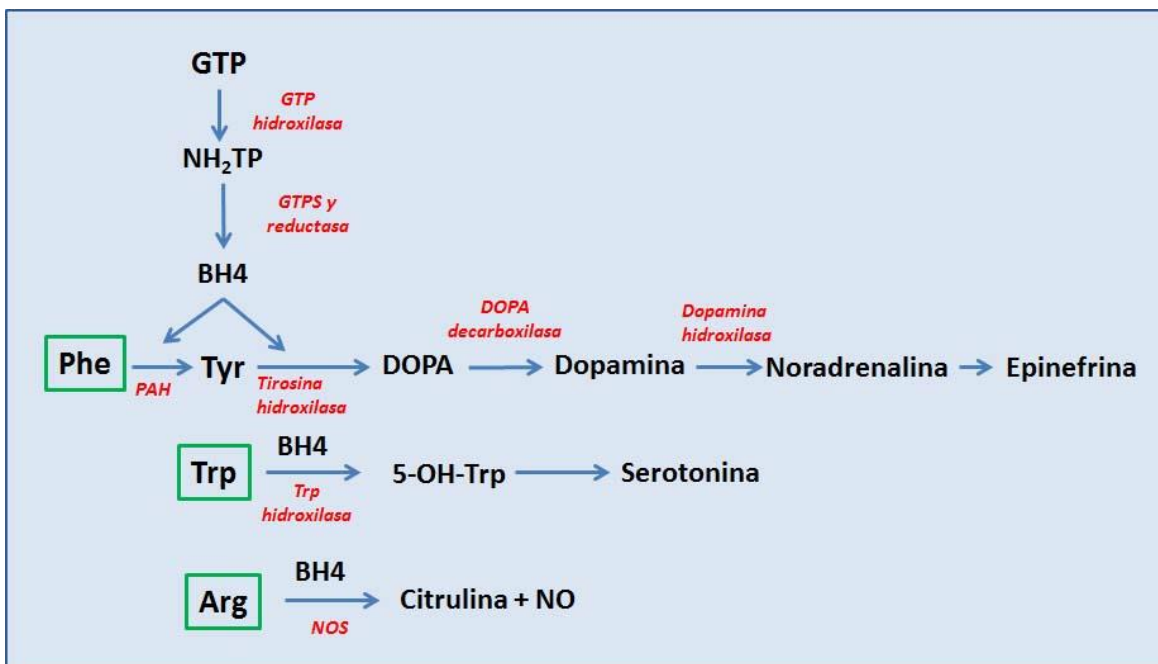


Figura 19.3. Metabolismo de BH₄ y Tyr. Los rectángulos verdes indican los aminoácidos esenciales

Frente a un déficit de PAH se producirá un aumento en los niveles circulantes de Phe y subsecuentemente se podrán estimular vías secundarias que lleven a la aparición de productos secundarios (Fig. 19.2). Entre ellos **Ac fenil pirúvico**, el cual se elimina por orina, producto que se asoció con retraso mental, y **Ac. Fenil acético**, el que se excreta también por orina y sudor y se asocia con el olor a moho o a ratón característico y descripto tempranamente en la PKU.

Clasificación de las Hiperfenilalaninemias

Los defectos causados por mutaciones en PAH son muy heterogéneos fenotípicamente debido a la posible combinación de un gran número de combinaciones alélicas. La clasificación Tabla 19.1 y Fig. 19.4, se basa en los niveles de Phe en sangre (al diagnóstico) y en la Tolerancia a la Phe (cantidad de Phe de la dieta capaz de mantener la concentración plasmática de Phe dentro de un rango recomendado).

Las HPA podríamos clasificarlas en categorías (Tabla 19.1): PKU y HPA persistentes.

Tabla 19.1. Clasificación de HPA

Diagnostico	Phe [mg/dL]	Tolerancia [mg / día]
PKU clásica	> 20	< 350
PKU moderada	10 – 20	350 - 400
PKU leve	2 - 10	400 - 600
HPA leve	2.5 – 6	> 600

Adaptado de Sanjurjo 2014

La **PKU** se asocian con retraso mental severo e irreversible y fenilcetonas en orina. La PKU clásica es una deficiencia de PAH con una actividad residual < 1%, la forma **moderada** y la forma **leve** presentan niveles de PAH < 10% del normal. La **deficiencia de BH4** (antiguamente PKU maligna), no responde al tratamiento y se asocia a falta de neurotransmisores.

Las **HPA** son formas benignas, no presentan daño neurológico, ni fenilcetonas en orina; tampoco requieren de tratamiento. Podemos tener las **HPA persistentes**, por déficit parcial de PAH, con una actividad residual < 35% del normal; HPA **secundarias** a ECM de Tyr; o HPA **transitorias** (del prematuro, o hijos de madres fenilcetonuricas), o **adquiridas** (infecciones, estados inflamatorios, insuficiencia renal crónica, insuficiencia hepática, uso de metrotexato o fármacos anti folato que inhiben la tetrahidrobiopterina reductasa).

Existen ciertas discrepancias en la clasificación de estas patologías en diferentes países, basados en la evidencia de mantener determinados niveles de Phe en todos los pacientes y el valor por encima del cual se requiere una intervención.

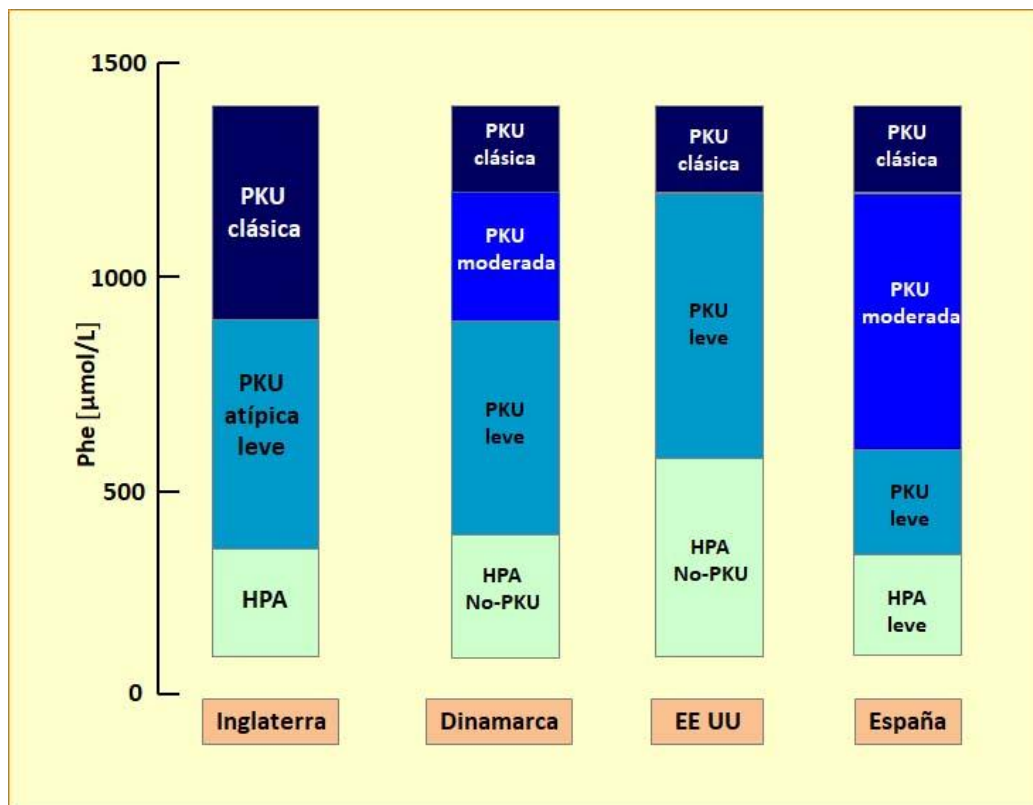


Figura 19.4. Clasificación de HPA, en diferentes países. Adaptada de Gramer, 2007 y de Sanjurjo, 2014.

Hay que considerar el efecto de las diferentes mutaciones sobre la actividad de la PAH. Existen genotipos con mutaciones severas que resultan en un fenotipo moderado a clásico y valores de Phe en sangre muy elevados. Por otro lado, mutaciones moderadas resultan en HPA moderadas y niveles de Phe en sangre más bajos.

La **PKU materna** es una embriopatía observada en hijos de madres afectadas de PKU que presentan concentraciones de Phe plasmática elevada durante los meses previos y/o durante la gestación. La Phe causa un efecto teratógeno, si es >6 mg/dL, puede producir daño fetal. Se presenta un cuadro similar al síndrome alcohólico-fetal. Si los niveles de Phe > 15 mg/dL puede haber microcefalia, retraso mental, enfermedad cardíaca, retraso de crecimiento, malformaciones congénitas, atresia esofágica, dimorfismo facial, abortos espontáneos. La PKU materna requiere restricción dietaria controlada previo a la concepción (8 semanas).

PKU Clásica

Características clínicas

La PK clásica no tratada provoca alteraciones neurológicas irreversibles, con retraso mental irreversible, microcefalia y conducta psicótica, irritabilidad, retraso en la maduración, convulsiones, autoagresión y automutilación, autismo. El 25 % de los pacientes pueden presentar epilepsia

y anomalías en el EEG. Suelen presentar también hipo pigmentación de los ojos, piel y cabello y un olor característico (asociado con la producción de fenilacético).

El tratamiento precoz de estos pacientes es sumamente importante para prevenir estas alteraciones. Sin embargo, aun en pacientes de PKU con tratamiento temprano y continuo se ha observado un bajo *scores* del cociente intelectual, pero el control durante los primeros 10 años de vida es importante para el desarrollo cognitivo

Características Bioquímicas

Los pacientes presentaran niveles de Phe en sangre >20 mg/dL y también se hallan aumentados en otros líquidos corporales. Como consecuencia del déficit en PHA, se produce un aumento en vías alternativas que originas metabolitos secundarios Ac fenilpiruvico, Ac fenilacético, fenil etilamina, Ac hidroxifenilpiruvico. En la orina se detectan fenilcetonas.

Otra alteración ocurre en la formación de Tyr, lo cual lleva a una caída en la producción de catecolaminas, en la síntesis de melanina (pigmento de la piel), lo que explica la hipo pigmentación de la piel de estos pacientes.

Patogénesis

Se ha postulado que la hiperfenilalaninemia se asocia con daño en el cerebro a través de varios mecanismos, que conducen a la neurotóxica (Fig. 19.5). Se sabe que la Phe comparte el mismo mecanismo de transporte que otros aminoácidos neutros, el transportador LAT-1, que presenta mayor afinidad para Phe. Así, la neurotoxicidad podría ser secundaria a la acumulación de Phe en sangre y relacionada a los niveles de Phe en el cerebro.

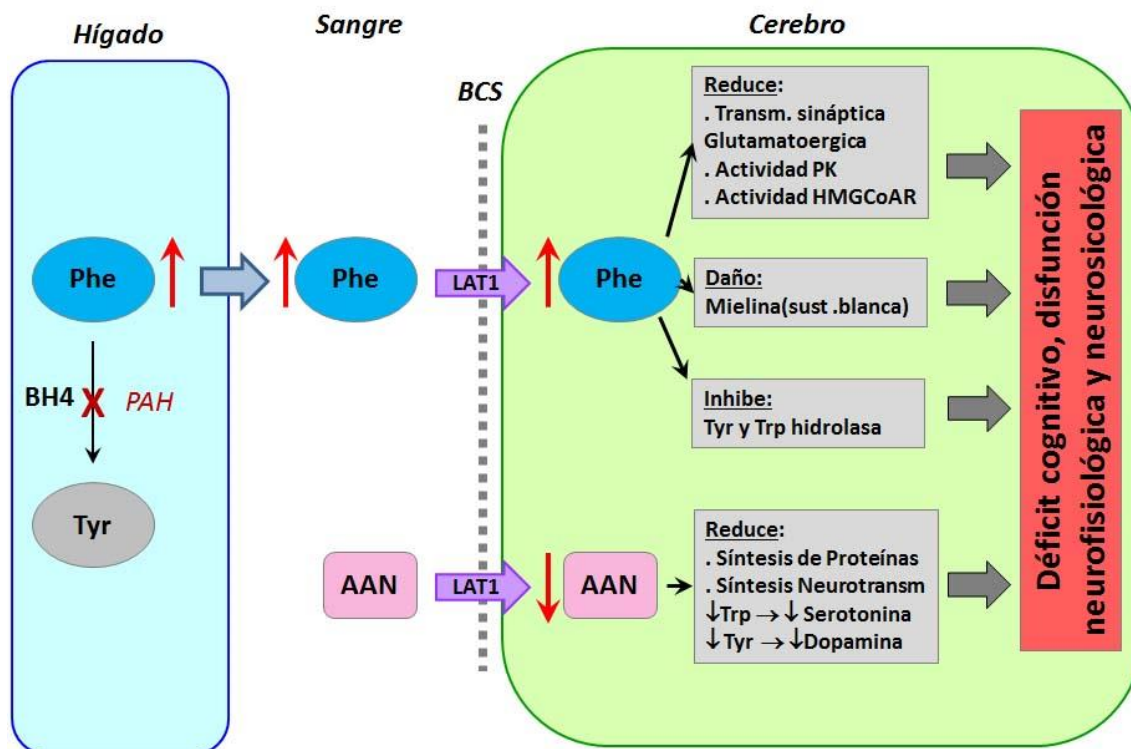


Figura 19.5. Mecanismos para las alteraciones neurocognitivas de las HPA. Phe, fenilalanina; BH4, tetrahydrobiopterina; Tyr, tirosina; PAH, fenilalanina hidroxilasa; BCS, barrera cerebro-sanguínea; AAN, aminoácidos neutros; LAT1, transportador de tipos L para amino ácidos neutros; PK, piruvato kinasa; HMGCoAR, hidroximetil glutaril CoA reductasa; Trp, triptófano. Adaptado de Feillet et al., 2010.

La disminución en los niveles de Tyr pueden asociarse con una disminución en la síntesis de dopamina y subsecuentemente de norepinefrina, con daño en la neurotransmisión.

Se ha observado una alta variabilidad en los niveles de Phe en sangre asociada con el daño en la función cognitiva. Los niveles de Phe en el cerebro también pueden variar con el tiempo, los pacientes con PKU muestran un rango amplio de Phe en cerebro. Existe evidencia que sugiere que esta variabilidad inter-individuo puede modular el transporte de Phe a través de la BCS.

Diagnostico Bioquímico

La detección precoz de PKU a través de pruebas de *screening* evita la discapacidad intelectual y otras alteraciones asociadas con esta patología. En 1963, Guthrie describió un método para detectar Phe en sangre, que puede aplicarse a nivel poblacional, usando sangre impregnada en papel de filtro. El fundamento es el bloqueo en la inhibición del crecimiento bacteriano de un compuesto agregado al medio de cultivo, y su evaluación como un halo de crecimiento alrededor del disco que contiene la sangre del paciente. Actualmente se utilizan métodos cromatográficos, fluorométricos, de inmunoensayos espectroscópicos, siendo paulatinamente desplazado por el uso de la espectrometría de masa en tándem. Si las concentraciones de Phe resultan superiores a 2-2.5 mg/dL, el paciente es remitido a un centro de referencia para PKU donde se debe realizar una confirmación, diagnóstico diferencial e inicio de tratamiento.

El diagnóstico se confirma por evaluación directa de los niveles de Phe en sangre (hplc o fluorometría). El diagnóstico diferencial requiere de la determinación de aminoácidos en plasma, para conocer la concentración de Tyr, que será baja en la deficiencia PAH y en los defectos en el metabolismo de BH4. En casos de otras patologías se encontraran normales o elevados. En orina es posible detectar aminoácidos y ácidos orgánicos. El diagnóstico diferencial también requiere descartar un defecto en el metabolismo de BH4, caso contrario se investiga la respuesta del paciente al tratamiento con BH4 para comprobar si puede ser tratado con este cofactor o debe introducirse la restricción dietaria de Phe.

La confirmación del defecto PAH es posible usando muestras de biopsia hepática, ya que no se expresa en fibroblastos. Sin embargo en toda célula nucleada está presente el gen que codifica para dicha enzima en el cromosoma 12, lo que permite el diagnóstico molecular.

Tratamientos

El tratamiento clásico consiste en la restricción de Phe en la dieta. Como ya se mencionó, es importante iniciar el tratamiento lo antes posible (antes de 15 días de vida). Esto se hace una reducción de alimentos que contienen Phe, combinado con fórmulas especiales libres de Phe, suplementada con Tyr, micronutrientes y el resto de aminoácidos que contiene la leche..

En caso de detectarse una deficiencia de BH4, la restricción dietaria de Phe no tendrá efecto, En esos casos se debe administrar BH4 (KUVAN), aunque es un tratamiento actualmente disponible es muy caro. También se administración de L-Dopa, 5OH Trp (precursor de serotonina) y Carbidopa (inhibidor de la enzima que transforma DOPA lleva a la producción de dopamina).

Referencias

- Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet* 2010; 376: 1417–27.
- Borrajo GJ. Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 466–81.
- Feillet F, van Spronsen FJ, MacDonald A, Trefz FK, Demirkol M, Giovannini M, Bélanger-Quintana A, Blau N. Challenges and pitfalls in the management of phenylketonuria. *Pediatrics*. 2010 Aug;126(2):333-41.
- Gramer G, Burgard P, Garbade S F, Lindner M. Effects and clinical significance of tetrahydrobiopterin supplementation in phenylalanine hydroxylase-deficient hyperphenylalaninaemia. *J Inherit Metab Dis* (2007) 30:556–562.
- Sanjurjo P & Baldellou A. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 4ta Edición. Ergon c Arboleda I 2014.
- Scriver CR et al. (Eds). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw Hill, 2002.

Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, Braverman NE, Burton BK, Frazier DM, Mitchell J, Smith WE, Thompson BH, Berry SA; American College of Medical Genetics and Genomics Therapeutics Committee. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genet Med*. 2014 Feb;16(2):188-200.

CAPÍTULO 20

Fibrosis Quística

Ana M. Cortizo

Introducción

La Fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva letal, causada por mutaciones en el gen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), que codifica para un canal de Cl⁻. Está caracterizada por obstrucciones crónicas, infección del tracto respiratorio, insuficiencia pancreática exócrina y sus consecuencias nutricionales y niveles elevados de electrolitos en el sudor. Es la enfermedad AR fatal más común en la población caucásica, con una incidencia de 1:2000 a 1:3000 nacidos vivos.

La historia de la FQ comienza con referencias en el folklore medieval de algunas regiones del centro y norte Europeo, en los que se describe como “pobre niño aquel al que al besarle su frente sabe a sal, un embrujo pesa sobre él y no tardara en morir”, expresando de esta manera la malignidad de la misma. El criterio diagnóstico actual del sudor salado parece haber sido una premonición de enfermedad, agotamiento y muerte temprana. En 1945, Farber llamo a la enfermedad “mucoviscidosis” para destacar la característica de mucus viscoso, pensando que la enfermedad era una forma generalizada de mucus viscoso. En 1946, Andersen y Hodges presentaron la primera evidencia que la enfermedad es genética y resulta de una mutación autosómica recesiva.

En 1952, una impresionante ola de calor en NY llevó a una alta incidencia de postración por el calor entre muchos de sus pacientes en el Hospital de Columbia, lo que llevo a Kessler y Anderson a informar que los pacientes, que padecían de FQ respondían adversamente al calor sin precisar su mecanismo. La pérdida masiva de sal en el sudor se asoció con esta enfermedad. En 1959 Gibson y Cooke, describieron un método para la determinación de la concentración de electrolitos mediante la prueba de estimulación del sudor por iontoforesis de pilocarpina, que permitía confirmar las sospechas clínicas de la enfermedad.

En 1981, Knowles, Gatzky y Boucher reportaron que el potencial eléctrico negativo a través de las vías aéreas nasales de los fibroquísticos era significativamente mayor que en los normales. Casi al mismo tiempo Quinton, demostró en la glándula del sudor la impermeabilidad iónica en los pacientes fibroquísticos y no un defecto en el intercambio iónico.

Finalmente, en 1989, Lap-Chee Tsui, John Riordan, Francis Collins en forma separada, clonado del gen CFTR.

Características patológicas y clínicas de la FQ clásica

La FQ es una enfermedad compleja, multisistémica: afectando pulmones, tracto respiratorio superior, tracto gastrointestinal, páncreas, hígado, glándula del sudor, tracto genitourinario. Se presenta en diferentes formas y simula una serie de otras entidades clínicas. La presentación usual incluye tos persistente e infiltrados recurrentes o refractarios pulmonares y también refleja perturbaciones gastrointestinales, como el íleo meconial en aproximadamente 10% de los pacientes así como también falla para crecer con esteatorrea. Algunos pacientes escapan a la detección en la primera década de vida debido a que los síntomas son inusuales, o aun ausentes.

Tracto Respiratorio

Patología. El compromiso pulmonar es la causa de morbi- mortalidad de esta enfermedad. Aunque el curso clínico es muy variable, se observa una progresiva disminución de la función pulmonar, que lleva a falla respiratoria y muerte. La supervivencia promedio (2009-2013) se ha estimado en 40.6 años en EEUU y en 50.6 años en Canadá.

El mucus obstructivo e infección se hallan confinados, al menos inicialmente, a las vías aéreas conductivas, la obstrucción mucosa de los bronquiolos con inflamación de la pared bronquiolar. La enfermedad de las vías aéreas conductivas se adquiere postnatalmente, sugiriendo hipersecreción o acumulación de secreciones con propiedades anormales a temprana edad y como el evento patogénico primario.

A medida que progresa la enfermedad, hay bronquiolitis y bronquitis, la glándula submucosa se hipertrofia, las células goblet aumentan en número y se extienden en los bronquiolos. Se desarrollan áreas focales de metaplasia escamosa y se puede dañar el clearance del mucus. Debido a ciclos repetidos de obstrucciones e infecciones hay bronquielectasis y luego bronquiectasis. En la autopsia puede observarse extensa sobreinflación de los espacios aéreos con áreas dispersas de enfisema destructivo. Una acelerada fibrosis peribronquial y peribronquial contribuyen al patrón de restricción funcional pulmonar que es sobreimpuesto a la obstrucción en la enfermedad pulmonar avanzada.

La hipertrofia e hiperplasia de los elementos secretorios, acumulación de mucus y cambios inflamatorios crónicos también son característicos de los sinusoides paranasales y canales nasales. Una característica común de la patología nasal es el edema inflamatorio de la mucosa con subsiguiente pedunculación y formación de pólipos.

Patogénesis de la infección pulmonar. La infección crónica del tracto respiratorio parece ser el proceso más destructivo. La infección de las vías aéreas de los pacientes fibroquísticos puede ser única, particularmente respecto a su confinamiento al espacio endobronquial. Los patógenos involucrados son primariamente *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, una vez establecida, la infección pulmonar es prácticamente imposible de erradicar.

Una razón posible para la falla en la defensa pulmonar y colonización bacteriana de las vías aéreas es un defecto en el clearance mucociliar. Parecería que ciertas alteraciones del entorno,

llevan a una mayor adhesión bacteriana. Las proteinasas son capaces de interferir con la función de las cilias y exaltar la adherencia bacteriana a las células epiteliales.

Manifestaciones clínicas. La manifestación más temprana de la enfermedad pulmonar fibroquística es generalmente la tos. Primero es intermitente, coincidiendo con episodios de infección aguda del tracto respiratorio, pero esta persiste más de lo esperado. Con el tiempo la tos se vuelve un evento diario, a medida que la enfermedad progresa, la tos se vuelve productiva y luego paroxismal. El esputo es generalmente tenaz, purulento y con frecuencia verde, esto último refleja la infección por *P. aeruginosa*. Puede notarse la hiperinflación del pulmón, en los primeros años de vida se nota un silbido debido a la inflamación y edema de las vías aéreas pequeñas.

Los paciente fibroquísticos pueden tener solamente síntomas bronquíticos por largos períodos, pero eventualmente aparece una exacerbación de síntomas, como aumento en la intensidad de la tos, taquipnea, acortamiento del pecho, disminuida actividad y apetito, y pérdida de peso. La enfermedad pulmonar terminal se asocia con una franca limitación de actividades y con una secuencia de eventos terminales que incluyen hipoxemia sustancial, hipertensión pulmonar, cor pulmonale, y muerte.

La mayoría de los pacientes presentan rinitis crónica, con incrementado volumen de las secreciones aéreas superiores y moderada obstrucción del flujo aéreo. Los pólipos nasales se presentan en 15-20 % de los pacientes, son más comunes al final de la primera década y durante la segunda década de vida.

Las vías aéreas de los CF son colonizadas tempranamente con bacterias y una vez establecida es muy difícil de erradicar. *S. aureus* y *Haemophilus influenza* son con frecuencia los primeros organismos detectados. *P. aeruginosa* se puede cultivar de las secreciones meses a años más tarde, aunque está presente desde el diagnóstico cada vez más frecuentemente. La recuperación de *P. aeruginosa*, particularmente la forma mucoide, del tracto respiratorio inferior de niños o adultos jóvenes con síntomas pulmonares crónicos es virtualmente diagnóstico de CF.

El cambio radiográfico más temprano es usualmente la hiperinflación de los pulmones. El impacto del mucus en las vías aéreas puede verse como sombras en forma de dedos o ramificadas. Evidencia de bronquiectasis tales como sombras en anillos agrandados es común entre los 5 y 10 años de edad. Tomografía computada de tórax es preferible para documentar la localización de la bronquiectasis.

Se cree que los recién nacidos tienen una función pulmonar normal. Sin embargo, a las pocas semanas los infantes con FQ muestran evidencia de incrementada resistencia aérea, atrapamiento de gas y velocidades de flujo disminuidas. Hay un incremento en el gradiente de O₂ alveolar-arterial, que refleja una insuficiente ventilación-perfusión. Las pruebas para seguir la función pulmonar incluyen espirometría, medidas del volumen pulmonar y de la oxigenación. Hay un progreso desde una obstrucción aérea periférica a una obstrucción más generalizada hasta la adquisición de un componente restrictivo. La oxigenación disminuye lentamente a lo largo de la vida. La oxigenación tisular parece estar además comprometida por la falla de los eritrocitos fibroquísticos para incrementar adecuadamente sus niveles de

2,3-difosfoglicerato a medida que progresa el compromiso pulmonar. La tolerancia al ejercicio está relacionada a la severidad de la obstrucción aérea. El ejercicio mejora la respuesta cardiorrespiratoria pero no de las pruebas funcionales de pulmón. El gasto de energía en reposo se encuentra elevado en los pacientes con FQ.

Complicaciones de la enfermedad del tracto respiratorio. Atelectasia global o segmental ocurre en aproximadamente el 5% de los fibroquísticos, siendo más común en los primeros 5 años de vida. Neumotórax es una complicación más frecuente, los pacientes presentan un acortamiento del pecho, con dolor y hemoptisis. La hemoptisis es un evento común en los pacientes añosos y correlaciona con la evidencia clínica y radiológica de bronquiectasis. La osteoartropatía pulmonar hipertrófica ocurre en 15% de adolescentes y adultos, la falla respiratoria y cor pulmonale son los eventos finales. Mientras que la hipoxemia progresiva es característica de esta enfermedad, la hipercapnia ocurre solamente semanas a meses antes de la muerte.

Tracto Gastrointestinal

Patología. La glándula de Brunner del duodeno se encuentra hipertrofiada, con ductos dilatados y el lumen acinar lleno de moco. El apéndice usualmente muestra hiperplasia de células goblet y acumulación de secreciones en las criptas y en el lumen, cambios que pueden ser diagnóstico de FQ.

Manifestaciones clínicas. El Íleo meconial ocurre en 10-20% de recién nacidos con FQ y es virtualmente diagnóstico. Esta patología se debe a la falla de la secreción de enzimas pancreáticas y así a la digestión del contenido intraluminal in útero, también causado por la deshidratación de los contenidos intestinales debido a una disfunción en el transporte epitelial in útero. Los niños no pueden procesar el meconio en los primeros 1 o 2 días de vida, desarrollan distensión abdominal y proceden a la emesis bilious. Ocasionalmente ocurren perforaciones y peritonitis acompañada por shock inter-venoso.

Más allá del período de recién nacido, puede ocurrir obstrucción del intestino delgado por una serie de razones. Quizás la más común (20% pacientes) se ha llamado equivalente al íleo meconial o síndrome de obstrucción intestinal distal, a la obstrucción que ocurre en el íleo terminal y se halla asociada con un contenido intestinal voluminoso, espeso e incompletamente digerido. En general esto ocurre después de una comida con alto contenido en grasa o en los casos en que la terapia de reemplazo de enzimas pancreáticas no tiene un buen resultado.

El prolapso rectal ocurre en 20% de niños, pero es infrecuente en adultos con FQ. Los factores que contribuyen se relacionan con materia voluminosa que se adhiere a la mucosa rectal, pérdida de grasa perirectal, y un aumento en la frecuencia de alta presión intra-abdominal a la tos paroxismal.

Enfermedad Pancreática

La insuficiencia pancreática exócrina está presente desde el nacimiento en la gran mayoría de los pacientes fibroquísticos.

Patología. El páncreas es anormal en casi todos los casos y se observa virtualmente destruido en la mayoría de los casos en la autopsia. La obstrucción de los ductos por secreciones condensadas es una característica temprana, seguida por dilatación de los ductos secretorios y acinos y aplanamiento de los epitelios. La pérdida de células de los acinos se encuentra ampliamente distribuida, y las áreas de destrucción se hallan reemplazadas por tejido fibroso y grasa. Puede ocurrir la calcificación intraluminal, la cual puede verse por radiografía. Los islotes de Langerhans se hallan relativamente dispersos por ciertos períodos, más tarde ocurren distorsiones debido al tejido fibroso que puede interrumpir el flujo sanguíneo o constituir una barrera entre las células secretoras de hormonas y el espacio vascular.

Manifestaciones Clínicas. La deficiencia de enzimas pancreáticas causa mala digestión de grasas y proteínas, produciendo un abdomen distendido y con deposición de mal olor, grasosa y voluminosa. Hay una falla para ganar peso y por último falla para crecer. En general la digestión de carbohidratos no se halla severamente dañada. Hay déficit en la absorción de vitaminas solubles en grasa que usualmente produce síntomas. Deficiencia de vitamina A, aunque rara, puede llevar a incrementada presión intracraneal, exoftalmia y ceguera a la noche. El raquitismo por déficit de vitamina D es raro, aunque los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D pueden estar reducidos. Hay desmineralización ósea en el 40% de los pacientes, disminución en la densidad mineral ósea que ocurre principalmente en la primera década de vida. La osteomalacia (desmineralización ósea en el adulto) se ha reportado en un adulto con FQ y cirrosis biliar. La deficiencia de vitamina E es común en pacientes sin suplementos; los factores de coagulación dependientes de vitamina K también pueden ser deficientes, resultando ocasionalmente en severa diátesis hemorrágica. La deficiencia en B12 ocurre infrecuentemente; mientras que el piridoxal 5' fosfato también puede ser bajo en el plasma de los pacientes fibroquísticos, correlacionando con los valores de las pruebas de función hepática.

El aumento en la pérdida fecal de ácidos biliares también parece contribuir a la mala absorción de grasas. La severa mala digestión y malnutrición durante los primeros 6 meses de vida puede inducir hipoproteinemia y anasarca (edema generalizado). Este síndrome, acompañado a veces por anemia hemolítica y esteatosis hepática, puede ser la manifestación de presentación en hasta el 8% de los pacientes con CF.

Diabetes. La disfunción pancreática endocrina tiene una predilección por los pacientes con más años de FQ (57 % incidencia de tolerancia a la glucosa alterada). La respuesta de la insulina a una carga de glucosa oral está retardada en casi todos los sujetos fibroquísticos y se observa que la administración de glucosa no suprime los niveles de glucagón plasmático. Las respuestas de insulina y glucagón en estos pacientes difieren de la de los pacientes con DMI, quienes muestran una más profunda insulinopenia y una incrementada respuesta de glucagón a la estimulación con Arg. Las células beta ocupan el 28% del área de los islotes, comparada con menos del 10% en DM I y más de 50% en sujetos controles. El área de células de glucagón es normal, a diferencia del incremento en los DM I. Además el número de islotes se halla disminuido en el páncreas de CF. Los receptores de insulina sobre monocitos están aumentados pero tiene una alterada

afinidad por la insulina. La presentación de hiperglucemia sintomática es la misma para sujetos con FQ y DM I, es decir, con una abrupta aparición de sed, poliuria y pérdida de peso. La hiperglucemia de los fibroquísticos induce cambios microvasculares en la retina y el riñón si el desorden es suficientemente largo. Una característica es la virtual ausencia de cetosis.

Enfermedad Hepatobiliar

Los cambios hepáticos son variables. En autopsia se ven islas de parénquima relativamente normal rodeadas por bandas fibróticas, creando una apariencia distintiva multilobular. Microscópicamente, esta cirrosis biliar lobular está caracterizada por condensación de secreciones dentro de los ductos biliares, proliferación de los ductos, reactivación inflamatoria peri portal y fibrosis. Se puede detectar elevados niveles de fosfatasa alcalina hepática en suero. La cirrosis biliar sintomática ocurre en 2-5% de los pacientes con FQ y se presenta con hiperbilirrubinemia, ascitis y edema periférico. La presencia de hepatoesplenomegalia es virtualmente diagnóstico de cirrosis con hipertensión portal. Puede haber infiltración de grasa, en respuesta a una inadecuada nutrición. La coleditiasis, a veces con cólicos biliares, se diagnostica antes de la muerte en hasta 12% de pacientes de larga data, se ha detectado tan temprano como a los 3 años de vida. La vesícula también es anormal.

Tracto genitourinario

Más del 95% hombres fibroquísticos presentan estructuras de los ductos de Wolffian alteradas. La vías deferentes, cola y cuerpo del epidídimo y la vesícula seminal son atróficas, fibróticas o completamente ausentes. La patogénesis se relaciona a la obstrucción temprana, con frecuencia intrauterina, del tracto genital con secreciones condensadas. En la segunda década de vida se manifiestan fallas en la función reproductiva. Los cambios reflejan la ausencia de secreciones de la vesícula seminal. La anomalía genitourinaria de FQ se debe a azoospermia. La fertilidad en la mujer con FQ es mayor de 10%, siendo comunes las irregularidades menstruales y la oligomenorrea. Muchas mujeres son anovulatorias debido a la pobre nutrición y a infecciones pulmonares crónicas. El retraso puberal también es común en hombres y mujeres fibroquísticos.

Glándula del sudor

La alteración funcional más consistente en la FQ, son las elevadas concentraciones de sodio y cloruro en el sudor. Los niños fibroquísticos pueden tener sabor a sal y tener cristales de sal en su piel después de la sudoración. Una excesiva pérdida de sudor provoca tanto la liberación de aldosterona como intentos por retener sales por el riñón. La glándula del sudor de los pacientes fibroquísticos es relativamente refractaria a los mineralocorticoides. Los niños pueden desarrollar profunda hipocloremia, hiponatremia y alcalosis.

Otras manifestaciones

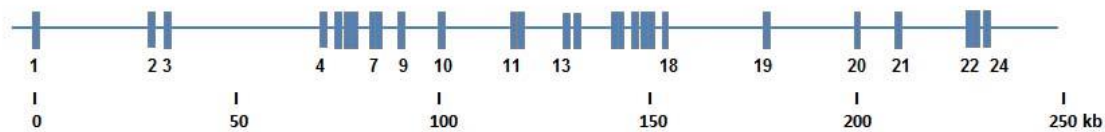
Puede observarse Osteoporosis, baja densidad mineral y fragilidad ósea. Los factores de riesgo asociados con esta condición son, la insuficiencia pancreática, mala digestión, desnutrición, baja absorción de Ca y vitamina D, falta de ejercicio, disminución en los esteroides sexuales, uso de corticoides, citoquinas que activan osteoclastos, Hay baja formación ósea y aumento en la resorción.

El gen CFTR y las mutaciones

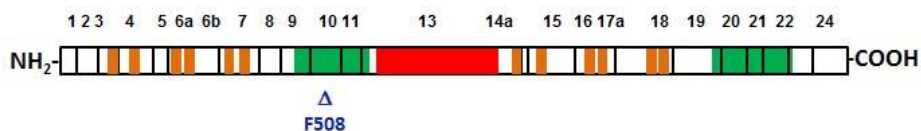
El mapeo de genes de una enfermedad sin conocimiento del defecto bioquímico, como en el caso de la FQ, conocido como clonado posicional, fue una estrategia adecuada cuando se introdujo el concepto de marcadores DNA polimórficos, en 1980s. El principal problema en FQ fue la falta de deleciones o translaciones cromosómicas conocidas asociadas con la enfermedad, con lo cual se hizo uso exclusivamente del análisis de ligamiento. Sin embargo, la abundancia de familias disponibles para este análisis compensó por el pequeño tamaño de las familias individuales, dada la naturaleza recesiva y la severidad de la FQ. Usando el ligamiento entre FQ y el DNA del marcador D7S15, se localizó el gen CF en el cromosoma 7 y usando datos de ligamiento de marcadores muy cercanos se sugirió que había un locus simple para el gen de la FQ. En 1989, el gen responsable de la FQ se identificó y se demostró que era el gene asociado a esta patología.

El gen CFTR se expande aproximadamente 230 kb y contiene al menos 27 exones (Fig. 20.1). El ARNm tiene alrededor de 6.5-kb y puede detectarse por Northern blot en varios tejidos afectados como pulmón, páncreas, glándulas del sudor, hígado, pólipos nasales, glándulas de la saliva y colon. El polipéptido deducido se lo llamó regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y contiene 1480 residuos de aminoácidos con una masa molecular calculada de 170.000.

Gen CFTR



Proteína CFTR



Modelo para la estructura CFTR

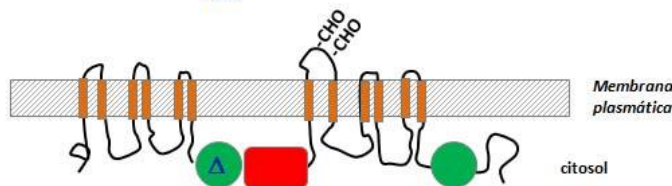


Figura 20.1. Esquema mostrando la secuencia de ARNm, la proteína y un modelo de estructura del CFTR. Los rectángulos naranjas representan los dominios de la proteína que expanden la membrana; los dominios verdes la zonas de unión al ATP, NBD; y los rectángulos rojos la región de que es regulada por PK A-AMPc, dominio R. Adaptado de Scriver, 2001.

La secuencia primaria muestra que CFTR contiene dos mitades similares, cada una de las cuales consiste de un dominio capaz de expandir la membrana 6 veces y otro conteniendo una secuencia de consenso para dominios de unión a nucleótidos (ATP) (NBD). La proteína predicha también tiene una alta proporción de residuos de aminoácidos cargados en una región inusual, llamada dominio-R, conectando las dos mitades de la proteína. Se cree que el dominio R tiene una función regulatoria.

Se han descrito múltiples sitios de iniciación de la transcripción para el gen CFTR, probablemente hay múltiples elementos positivos y negativos involucrados en la regulación de la transcripción de este gen. Además se han encontrado diferentes sitios de iniciación para el ARN preparado de diferentes fuentes. Usando RT-PCR se encontraron una serie de transcriptos (Splicing alternativo) del gen CFTR a los que les faltan algunos exones, en una fracción de ARN aislado de algunos tejidos y líneas celulares. En sujetos controles no fibroquísticos se detectó una amplia variación en la cantidad relativa de transcriptos a los que les falta el exón 9, la proporción de este ARNm más corto en muestras de epitelios nasal y bronquial varía entre 0 y 92%. Hay menos variaciones entre los cromosomas fibroquísticos.

Desde el clonado del gene en 1989, se han descrito más de 2000 variantes de CFTR en las bases de datos de mutaciones de FQ (CF Mutation Database, CFMD). Esto sirvió para hacer una clasificación para la FQ, en base a los mecanismos. Más recientemente se creó el proyecto de translación clínico y funcional de la FQ (*Clinical and Functional Translation of CFTR project*, CFTR2) para considerar la severidad de la enfermedad en los pacientes con FQ. Los investigadores reunieron los datos globales de los registrados de pacientes con FQ, la investigación funcional y los datos clínicos para armonizar una terminología de nomenclatura sobre las variantes del CFTR. El CFTR2 definió cuatro categorías de mutaciones basadas en criterios clínicos, análisis funcional y datos poblaciones y de penetrancia (Tabla 20.1).

Tabla 20.1. Definición clínica de mutaciones, proyecto CFTR2

Mutaciones	Definiciones Clínicas
Causan FQ	[Cl ⁻] sudor ≥ 60 mmol/L en pacientes con mutaciones presentes en trans con mutaciones conocidas que causan FQ
Variantes de variable consecuencia clínica	Variantes que pueden o no llenar los criterios de FQ Variantes que no satisfacen los criterios clínicos y funcionales (pero pueden satisfacer uno u otro, o ninguno)
No causan FQ	Evidencia clínica no considerada
Variantes de significado desconocido	Análisis incompleto o No se puede asignar una caracterización de responsabilidad de la enfermedad

La mutación mayoritaria en la FQ, llamada $\Delta F508$, o F508del, es una delección de 3-bp que remueve el residuo de Phe en los aminoácidos en la posición 508 del CFTR; esta mutación explica alrededor del 70% de los cromosomas mutados en todo el mundo. Hay marcables diferencias en la proporción de cromosomas fibroquísticos con la $\Delta F508$ entre diferentes poblaciones, en general se encuentra una mayor frecuencia en los pacientes europeos del norte en comparación con los europeos del sur, en un rango de 30 a 35% en poblaciones de judíos Askenazis a un 87% en Dinamarca.

Hasta diciembre de 2017, se anotaron 374 variantes, de las cuales 312 son consideradas causantes de FQ, 36 son del tipo 2, 13 del tipo 3 y 13 caen en la última categoría.

Se han identificado diferentes tipos de mutaciones en el gene CFTR. Alrededor de la mitad de las mutaciones reportadas en CFTR son sustituciones de un aminoácido (mutaciones missense). Otros tipos de mutaciones –nonsense, frameshift, y splicing de ARNm– constituyen el resto. Hay unas pocas delecciones de un aminoácido simple, una delección grande en el marco, y una solo caso de una delección compleja en la cual los exones 4 al 7 y 11 al 18 se suprimieron, pero los exones 8 al 10 están aparentemente intactos. No se han descrito delecciones en el promotor. Hay claramente puntos calientes de mutaciones, una región en el exón 11, que corresponde al NBD1 de la proteína parece tener la más alta densidad de mutaciones. También se han encontrado ejemplos que indican que dos mutaciones independientes pueden coexistir sobre el mismo cromosoma y puede haber un efecto de atenuación sobre la enfermedad, un fenómeno de complementación intra-génica.

La proteína CFTR

La identificación de la secuencia primaria de CFTR permitió predecir una estructura potencial, basada en la comparación con una familia de proteínas llamadas ATPasas de tráfico o transportadores ABC (ATP binding cassette) (Fig. 20.1). CFTR contiene 5 dominios: dos dominios que expanden la membrana (MSD), cada uno compuesto de 6 segmentos transmembrana; un dominio R, que contiene varias secuencias de fosforilación de consenso; y dos dominios de unión

a nucleótidos (NBD), a través se une ATP y es hidrolizado. El dominio R, con sus varios sitios de fosforilación potenciales y múltiples aminoácidos cargados, es una característica única del CFTR, no compartidas por otras proteínas de la familia de transportadores ABC. También se han descrito otras funciones para el CFTR, por ej., regula negativamente el transporte de sodio transepitelial, en particular el canal ENaC; también regula los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ y canales de K⁺ y participa en funciones importantes de exocitosis y la formación de complejos moleculares en la membrana plasmática.

La proteína CFTR se expresa predominantemente en los epitelios, incluyendo las células de los ductos pancreáticos, glándulas salivales, intestino, pulmón, testículos, y endometrio. Por RT-PCR también se ha identificado en linfocitos, monocitos, neutrófilos, y fibroblastos. Usando anticuerpos se ha localizado el CFTR en la región apical de las células de los epitelios polarizados.

El CFTR es un canal de Cl⁻ que es regulado por PK-A en una forma dependiente de AMPc (Fig. 20.2). Bajo condiciones basales, hay muy poco o casi ninguna corriente de Cl⁻; pero después del agregado de agonistas de AMPc, se produce un dramático incremento en la corriente de Cl⁻, lo cual puede ser evaluado a través de técnicas de patch-clamp con células enteras o de canales simples. Un aumento en Ca²⁺ no activa los canales de Cl⁻ CFTR. Este canal presenta características específicas que lo caracterizan:

- conductancia pequeña (6 a 10 pS)
- relación Intensidad - Voltaje lineal
- selectivo para aniones sobre los cationes.
- secuencia de permeabilidad a aniones es Br⁻ > Cl⁻ > I⁻ > Br⁻
- Actividad regulada por fosforilación dependiente de AMPc y nucleótidos-TP

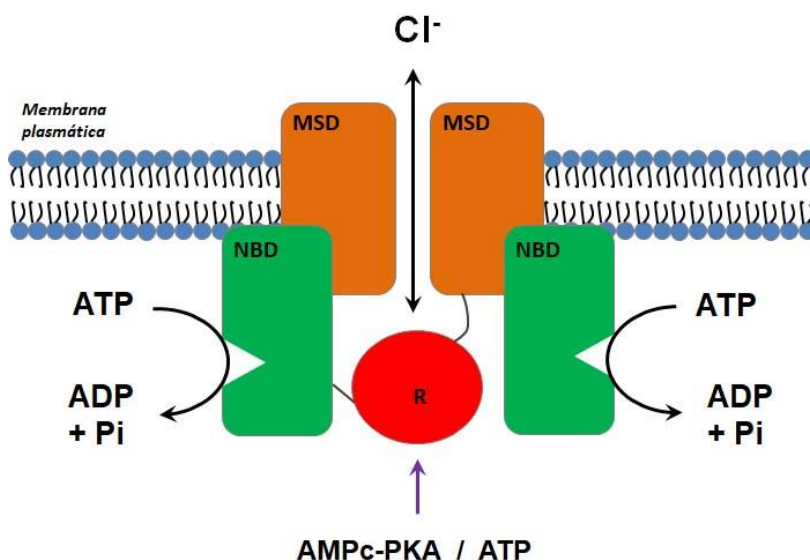


Figura 20.2. Esquema que muestra un modelo de la estructura del CFTR y sus dominios, MSD, dominio que expande la membrana; NBD, dominio de unión al ATP; R, dominio regulatorio. Adaptado de Scriver, 2001.

En la membrana plasmática apical forma parte de un ensamble multiproteico. Los tres aminoácidos finales (treonina, arginina, leucina) anclan el CFTR a un receptor de tipo PDZ, cerca de

receptores de membrana, canales iónicos y proteínas de citoesqueleto. En la FQ y en animales con delección para el gen *cftr*, la ausencia de CFTR regula la expresión de otros productos génicos

Los dominios R del CFTR contienen múltiples secuencias de consenso para fosforilación por PKA y PKC, por lo que se sugirió que la fosforilación de este dominio R podría abrir el canal de Cl⁻. Se demostró que agonistas de AMPc in vivo, o de PKA y ATP in vitro, fosforilan el CFTR. El control de la actividad de Cl⁻ CFTR depende del balance entre la actividad de quinasas y fosfatasas; aunque PKA parece ser la principal, otras quinasas también pueden fosforilar y abrir el canal. Isoformas de PKC dependientes e independientes de Ca²⁺ fosforilan y activan los canales de Cl⁻ CFTR, aunque a un nivel menor que el observado con PKA. Diferentes proteínas fosfatasas desfosforilan CFTR y cierran el canal, por ej. PP2A defosforila CFTR e inactiva el canal. Así, el balance entre la actividad de quinasas y fosfatasas determinará la actividad del canal y el transporte de iones transepitelial. Las diferencias en los niveles de segundos mensajeros y en la cantidad y localización de quinasas y fosfatasas en diferentes células pueden explicar los diferentes niveles de actividad del canal a nivel basal o estimulado. La delección de parte del dominio R produce canales de Cl⁻ que se hallan constitutivamente abiertos. Se cree el dominio R que manteniendo el canal cerrado y que su fosforilación puede liberar este efecto inhibitorio.

En la familia de transportadores ABC, los NBDs parecen ser sitios de hidrólisis de ATP. En algunos casos, la energía liberada durante la hidrólisis de ATP se usa para transportar sustratos activamente a través de la membrana celular. En el caso del CFTR la función de NBDs es un enigma.

Alteraciones Bioquímicas en el transporte epitelial

El transporte de electrolitos defectuoso, particularmente el transporte de Cl⁻ defectuoso, es la anomalía más destacada en el epitelio FQ. Los trabajos que llevaron a este descubrimiento fueron promovidos por dos aspectos clínicos de la enfermedad. Primero, los órganos clásicamente involucrados en la FQ –glándulas del sudor, vías aéreas, páncreas, glándulas salivales, epidídimos, e intestino- están todos compuestos de epitelios. Segundo, las secreciones de varios órganos parecen ser anormalmente espesas y deshidratadas, en consecuencia de lo cual ellas obstruyen los ductos de las glándulas. Estas observaciones llevaron a los estudios básicos del transporte de electrolitos en los epitelios fibroquísticos y a las anomalías encontradas en diversos órganos de los pacientes, lo que dio lugar una hipótesis que unifica los descubrimientos y conceptos sobre los defectos biológicos, relacionando las anomalías tisulares y celulares con el defecto genético y dando origen a los conocimientos sobre la Patofisiología.

Alteraciones en la glándula del sudor

La glándula del sudor está compuesta de dos regiones diferentes, la cola secretoria y el ducto reabsortivo (Fig.20.3). La cola secretoria produce un fluido aproximadamente isotónico, el que atraviesa el ducto reabsortivo, el cual es impermeable al agua. En esta región se absorbe el Na^+ y el Cl^- , de tal manera que el sudor que emerge en la superficie de la piel emerge un fluido hipotónico.

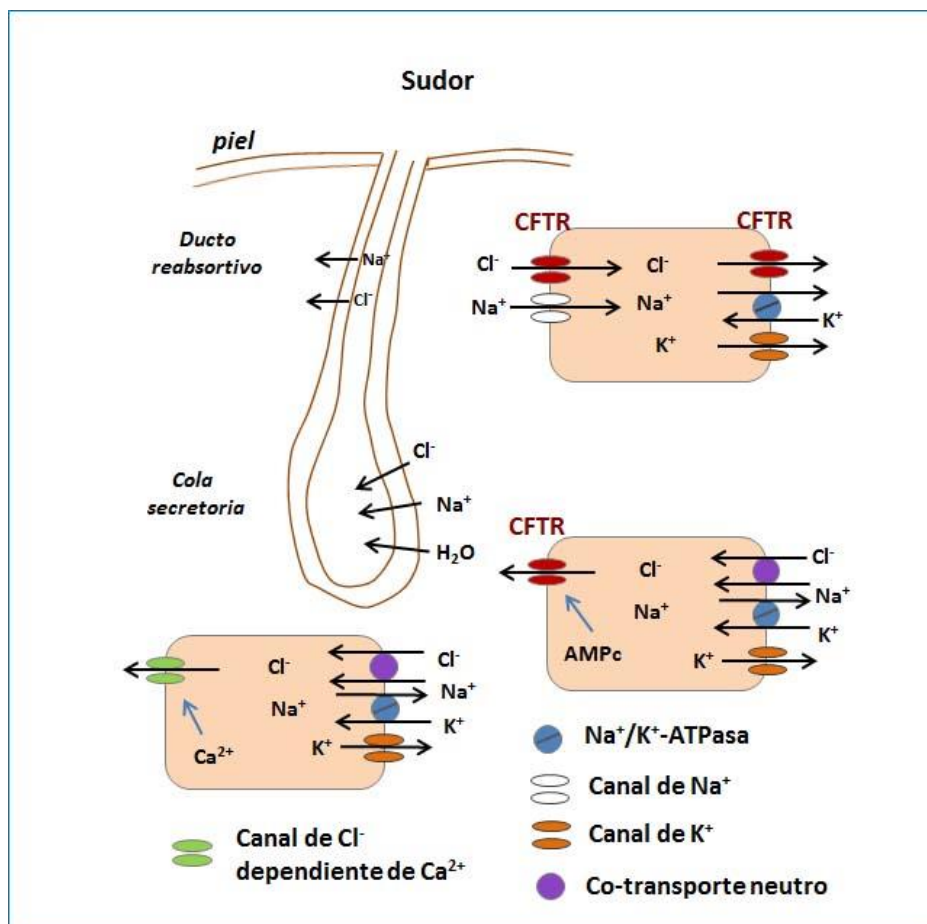


Figura 20.3. Esquema que representa la formación del sudor y los movimientos iónicos en la cola secretoria y el ducto reabsortivo. Adaptado de Scriver, 2001.

La observación clínica de que la concentración de Cl^- y Na^+ están aumentadas en los pacientes con FQ, llevó a Quinton y colegas a examinar las propiedades de transporte de iones de los ductos del sudor. Ellos encontraron que los ductos fibroquísticos tenían un voltaje transepitelial más alto que los ductos normales y sugirieron que el ducto del sudor en la FQ es impermeable al Cl^- y que el aumento en el voltaje transepitelial resulta de un mecanismo normal de absorción de Na^+ en presencia de impermeabilidad al Cl^- .

La cola secretoria de la glándula del sudor contiene al menos dos tipos de células que se hallan involucradas en la producción del sudor: morfológicamente, hay células claras y células oscuras, y funcionalmente hay células que responden al AMPc y agonistas β -adrenérgicos y células que responden a agonistas colinérgicos muscarínicos (Fig.20.3). EL CFTR está ubicado en la cara apical de las células y en respuesta a un aumento en AMPc se activan secretando Cl^- . El

Cl^- entra a las células desde la cara basolateral, a través de un sistema de co-transporte neutro con Na^+ . La fuerza directriz es generada por la bomba Na^+/K^+ -ATPasa que saca sodio y entra potasio, mientras que el K^+ intracelular es devuelto al exterior a través de un canal de K^+ . En los pacientes fibroquísticos, el defecto en el CFTR determina que el Cl^- no se pueda secretar en la cola secretoria por este mecanismo, pero sí a través del canal de Cl^- que responde al aumento en el Ca^{2+} intracelular. Por lo tanto, la cola secretoria de la glándula del sudor fibroquísticos puede secretar fluidos en respuesta a secretagogos que elevan dos diferentes segundos mensajeros. Los agonistas colinérgicos (muscarínicos) aumentan la concentración de Ca^{2+} intracelular, y estimulan la producción de sudor. Los agonistas β -adrenérgicos aumentan los niveles celulares de AMPc y estimulan la producción de sudor. La secreción dependiente de Ca^{2+} es normal en la FQ, mientras que el isoproterenol, un agonista β -adrenérgico, falla en estimular la secreción en los pacientes fibroquísticos. La anomalía no se debe a un defecto en la interacción hormona-receptor, dado que la acumulación de AMPc inducida por isoproterenol es normal en la FQ.

La absorción de Na^+ en el ducto de la glándula del sudor ocurre por entrada de Na^+ en la célula a través de la membrana apical, empujada por un gradiente electroquímico favorable (Fig. 20.3). El Na^+ luego sale a través de la membrana basolateral en intercambio por K^+ , un proceso mediado por la bomba Na^+/K^+ -ATPasa. El K^+ que entra a las células es reciclado vía canales de K^+ en la membrana basolateral. Estos procesos establecen la concentración de iones y los gradientes de voltaje que dirigen la absorción de Cl^- . Bajo condiciones basales, los canales de Cl^- en ambas membranas parecen estar constitutivamente abiertos. Sin embargo, la conductancia al Cl^- es estimulada por agentes que incrementan los niveles celulares de AMPc, ejercida a través del CFTR. El hecho que la conductancia al Cl^- es alta en epitelios sudoríparos aún en condiciones basales, sugiere tanto que los niveles basales de AMPc son relativamente altos, estimulando así la actividad quinasa y la fosforilación de los canales de Cl^- o que hay muy poca actividad de fosfatasas específicas, de tal manera que los canales de Cl^- permanecen en un estado fosforilado y activado. En el ducto de la glándula del sudor, la disminuida conductancia al Cl^- en los pacientes fibroquísticos explica la patofisiología: frente a un defecto en el CFTR, el Cl^- no puede seguir a la absorción de Na^+ ; de tal manera que la absorción de NaCl es suprimida y las concentraciones de Na^+ y de Cl^- en el sudor estarán aumentadas.

Epitelio Aéreo

Las infecciones recurrentes en las vías aéreas son la característica clínica más importantes de la enfermedad pulmonar fibroquística y se ha sugerido que existe un defecto en el sistema de defensa local.

La FQ involucra los epitelios que limitan las vías aéreas del pulmón. El epitelio aéreo proximal es un epitelio aéreo columnar pseudoestratificado compuesto de células ciliadas, células goblet y células basales. El epitelio aéreo distal está predominantemente compuesto de células ciliadas

y bronquiales no-ciliadas (Clara). Además el epitelio proximal contiene las glándulas de la submucosa que está compuestas tanto de células serosas y mucus y tienen un ducto compuesto de células cuboidales ciliadas y no-ciliadas.

Una importante función de los epitelios aéreos es el clearance mucociliar, la remoción de material particulado y toxinas inhaladas del pulmón. Para esto se requieren de 3 componentes:

- 1) Las ciliias proveen la fuerza mecánica para empujar el mucus hacia arriba y fuera del pulmón
- 2) las glándulas submucosas y, en menor grado, las células goblet, que producen el mucus, con propiedades viscoelásticas requeridas para atrapar el material particulado inhalado
- 3) el epitelio lleva a cabo el transporte de electrolitos transepitelial, que controla la cantidad y composición del fluido del tracto respiratorio y contribuye a la hidratación del mucus.

En las vías aéreas de los pacientes con FQ, se cree que la anomalía primaria en el transporte de electrolitos altera la cantidad de fluido del tracto respiratorio y posiblemente las propiedades del mucus, de tal manera que el sistema de defensa mucociliar se halla dañado.

Una serie de agentes neurohumorales y farmacológicos regulan la velocidad de transporte de electrolitos transepitelial en los epitelios aéreos, generando señales que regulan dos segundos mensajeros: AMPc y el calcio intracelular $[Ca^{2+}]_c$. Un aumento en los niveles de AMPc activa una PK dependiente de AMPc que fosforila y así regula los procesos de transporte de membranas específicos. Un incremento en $[Ca^{2+}]_c$ puede tener efectos directos sobre proteínas de transporte, como así también sobre quinasas dependientes de $[Ca^{2+}]_c$ y calmodulina. Un incremento en $[Ca^{2+}]_c$ y diacil glicerol (DG) pueden también activar PKC, que puede modular el transporte de electrolitos transepitelial.

La mayor parte de los agentes que incrementan los niveles de AMPc incrementan la permeabilidad al Cl^- en la membrana apical, y en varios casos, estimulan la secreción de Cl^- transepitelial. Los agonistas β -adrenérgicos se unen a sus receptores, activan una proteína G, que estimula adenilato ciclasa y aumentan los niveles intracelulares de AMPc. Los niveles de AMPc también aumentan en respuesta a agentes como el VIP (péptido inhibidor vasoactivo) y adenosina. Otros agonistas estimulan la secreción aumentando $[Ca^{2+}]_c$; por ej. la bradiquinina. Esta se une a sus receptores, estimula la hidrólisis de PI-4,5-P₂, que genera I-1,4,5-P₃ (IP₃), que a su vez aumenta el $[Ca^{2+}]_c$. Varios agentes también generan aumentos en el $[Ca^{2+}]_c$ como la sustancia P, leucotrienos, y nucleótidos como ATP. Los nucleótidos extracelulares son de particular interés, debido a que interactúan con receptores sobre la superficie apical del epitelio, y estimulan canales de Cl^- activados por Ca^{2+} y subsecuentemente la secreción de Cl^- , aún en epitelios fibroquísticos. Se conoce mucho menos sobre cómo es regulado el transporte de Na^+ . La velocidad de transporte de fluidos se ha estudiado en células de epitelios aéreo humano en cultivo. La absorción activa de Na^+ parece ser responsable de la absorción de fluidos bajo condiciones basales. Cuando el epitelio se trata con Amilorida y agonistas que incrementan los niveles intracelulares de AMPc, la secreción de fluidos continúa. El transporte de electrolitos puede fácilmente modificar el fluido de la superficie y se cree que la incapacidad de los epitelios fibroquísticos para modificar la velocidad del transporte de iones puede alterar significativamente la cantidad y composición de fluido del tracto respiratorio. Usando epitelios aéreos aislados, se demostró que hay

una absorción de Na^+ desde la mucosa hacia la superficie submucosa, y una secreción de Cl^- desde la submucosa a la superficie mucosa.

La Fig. 20.4 representa un modelo que describe nuestro actual conocimiento del transporte de electrolitos en los epitelios aéreos. Tanto las células del epitelio, ciliadas como las no ciliadas contribuyen al transporte transepitelial de Na^+ y Cl^- y existe un acoplamiento entre células a través de gap junctions mostrando como las células del epitelio aéreo secretan Cl^- y absorben Na^+ .

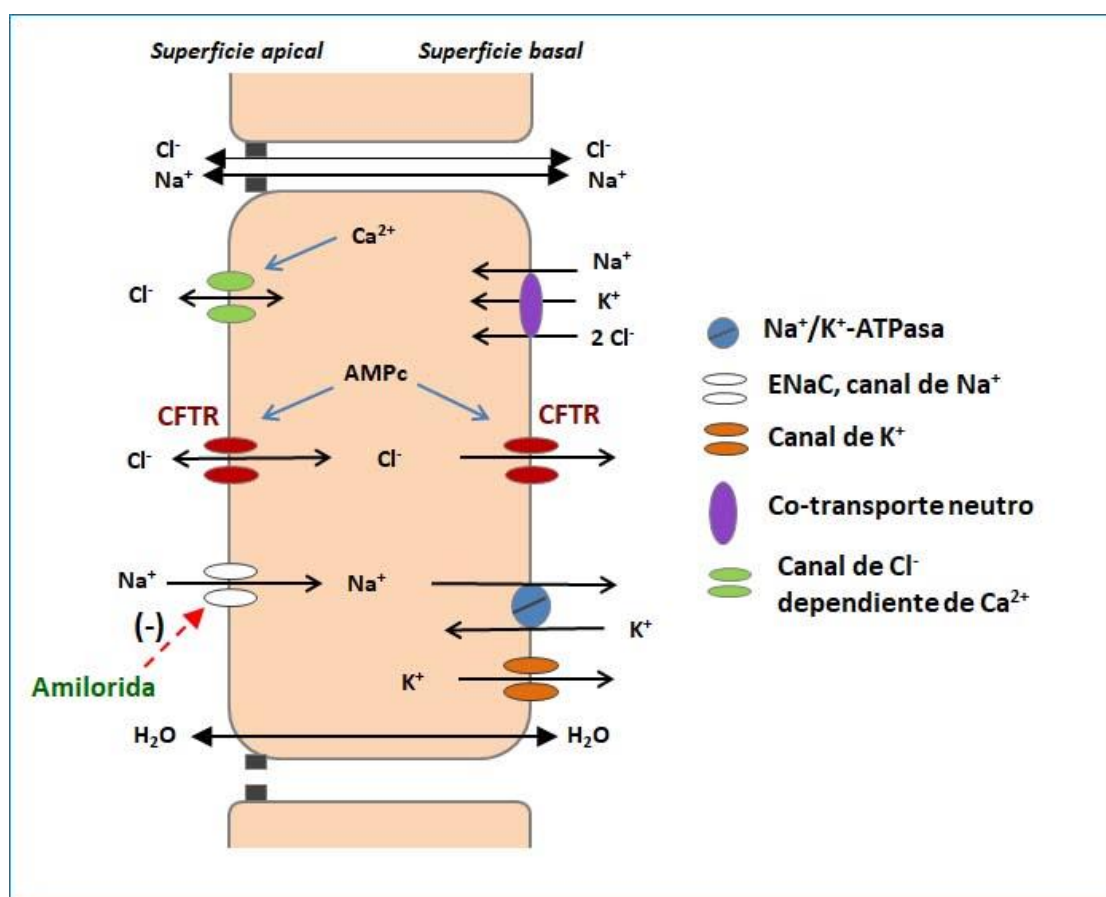


Figura 20.4. Esquema mostrando el transporte de electrolitos en células del epitelio aéreo. Adaptado de Scriver, 2001.

- 1) El Na^+ entra a la célula a través de la membrana apical vía un canal de sodio sensible a la Amilorida (ENaC), un mecanismo pasivo en el que el Na^+ se mueve a favor del gradiente electroquímico, dado que la $[\text{Na}^+]_{\text{intracelular}} \ll [\text{Na}^+]_{\text{solución apical}}$.
- 2) El Na^+ sale de la célula a través de la bomba Na^+/K^+ -ATPase ubicada en la membrana basolateral. Este sistema provee la energía para el transporte iónico manteniendo las bajas concentraciones de Na^+ intracelular y también acumula K^+ dentro de la célula.
- 3) El K^+ sale de la célula pasivamente a través de canales de K^+ ubicados en la membrana basolateral. La conductancia al potasio y el gradiente de concentración de K^+ hiperpolariza la célula, dando lugar a la fuerza eléctrica que dirige el transporte de Na^+ y Cl^- . Los canales de K^+ basolateral pueden ser estimulados por $[\text{Ca}^{2+}]_c$ o por un aumento en los niveles de AMPc.

- 4) Cl^- entra a las células a través de la membrana apical vía el CFTR allí localizado. El gradiente electroquímico para el Cl^- es pequeño y cercano al equilibrio; su regulación como se ha mencionado previamente ocurre a través de procesos de fosforilación.
- 5) La membrana apical también contiene canales de Cl^- regulados por $[\text{Ca}^{2+}]_c$, esto aporta un mecanismo alternativo para superar la pérdida de CFTR en los pacientes fibroquísticos.
- 6) El Cl^- sale pasivamente de la célula a través de un canal de Cl^- en la membrana basolateral.
- 7) La membrana basolateral contiene un sistema de co-transporte eléctricamente neutro que puede acoplar la entrada de 2 Cl^- a 1 Na^+ y 1 K^+ . El gradiente de concentración de Na^+ provee la fuerza directriz para la entrada de Cl^- y K^+ . Cuando el canal ENaC es inhibido con Amilorida (lo cual hiperpolariza la membrana apical), y los niveles de AMPc intracelular aumentan, el epitelio puede secretar Cl^- . Entonces, el Cl^- entra a la célula a través del cotransportador Na/K/2Cl y sale a través del CFTR.
- 8) La vía paracelular provee una ruta importante para el movimiento iónico transepitelial; una vía que es más permeable a los cationes que a los aniones.

Transporte Defectuoso en los epitelios CF. La observación clínica que las secreciones de las vías aéreas CF parecen espesas y deshidratadas llevó a Knowles y colegas a estudiar el transporte de electrolitos por los epitelios aéreos fibroquísticos, encontrando defectos a dos niveles. El primero es la ausencia del CFTR, lo que lleva a una falla del epitelio de pacientes con FQ para activar los canales de Cl^- en respuesta a agonistas que elevan el AMPc, resultando en una falla en la secreción de Cl^- estimulada por AMPc.

Por el contrario, la secreción de Cl^- estimulada por Ca^{2+} permanece intacta en el epitelio aéreo de los pacientes (Fig. 20.4). En segundo lugar, el epitelio aéreo fibroquístico también manifiesta una absorción de Na^+ anormal; la velocidad de absorción de Na^+ transepitelial vía ENaC, es 2 a 3 veces mayor que en los epitelios normales. Este anormal incremento en la absorción de Na^+ se debe a un incremento en la permeabilidad al Na^+ en la membrana apical. La permeabilidad al Na^+ puede ser inhibida por adición de Amilorida en la superficie apical; esta observación forma las bases de estudios dirigidos a usar Amilorida inhalada como intervención terapéutica en pacientes con FQ.

Se cree que el incremento en la velocidad de transporte de Na^+ y la disminuida permeabilidad al Cl^- se combina para producir un fluido del tracto respiratorio anormal, deshidratado.

Páncreas

El sistema secretorio pancreático parece estar compuesto de al menos dos sistemas funcionalmente distintos: el sistema acinar y los ductos pancreáticos. El sistema acinar secreta un volumen relativamente bajo de enzimas en respuesta a estimulación por colecistoquinina y acetilcolina. Los ductos pancreáticos pequeños secretan fluidos para incrementar tanto el volumen como el contenido de HCO_3^- del fluido luminal. En las secreciones de pacientes con FQ, se encontraron concentraciones más altas de proteínas que en los controles, primariamente debido a que el páncreas fibroquístico secreta menos fluido, sugiriendo que el sitio del defecto son los ductos. Estudios inmunohistoquímicos localizaron el CFTR en los ductos pancreáticos pequeños.

Se cree que en la membrana apical de los ductos, los canales de Cl^- funcionan en paralelo con los intercambiadores Cl^- , HCO_3^- para secretar un fluido rico en HCO_3^- . El Cl^- entra al lumen a través de canales de Cl^- , que es reciclado a través de la membrana apical en la célula, en intercambio por HCO_3^- . Un aumento en los niveles intracelulares de AMPc abre los canales de Cl^- apicales que tienen una baja conductancia, una relación corriente-voltaje (I-V) lineal, no son bloqueados por 4,4'-diisotiocianato-estilbena-2,2'-ácido disulfónico (DIDS), son bloqueados por 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) ácido benzoico (NPPB) y son más permeables al Cl^- que al I^- . Estas propiedades son similares a aquellas observadas para los canales de Cl^- en los epitelios aéreos y en células que expresan CFTR recombinante. La pérdida de secreción de fluidos estimulada por AMPc en los ductos pancreáticos fibroquísticos produce un fluido que es anormalmente deshidratado. Como resultado de esto, los ductos se vuelven cargados de secreciones espesas, y las obstrucciones pueden llevar a la destrucción del órgano.

Intestino

El intestino exhibe una diversidad de procesos abortivos y secretorios a lo largo de su longitud y en regiones específicas. La anomalía más consistente observada en los pacientes fibroquístico es la pérdida de secreción de Cl^- estimulada por AMPc. El mecanismo celular de secreción de Cl^- intestinal parece ser similar al de los epitelios aéreos (Fig. 20.4), con la entrada de Cl^- en la membrana basolateral vía un proceso de cotransporte de Na^+ , K^+ , 2Cl^- y salida de Cl^- a través de la membrana apical vía canales de Cl^- . Los canales de Cl^- que intervienen en la secreción dependiente de AMPc tiene propiedades similares a los CFTR: son activados por un incremento en los niveles celulares de AMPc o por PKA en parches aislados de membranas; tiene una conductancia pequeña; la relación I-V es lineal; son más permeables al Cl^- que al I^- ; son variablemente bloqueados por NPPB; y no son bloqueados por DIDS.

A diferencia de las vías aéreas, donde la secreción de Cl^- dependiente de Ca^{2+} es similar en los epitelios de individuos sanos y con FQ, la secreción de Cl^- estimulada por Ca^{2+} es defectuosa en el epitelio intestinal. Esto se explica por la falta de canales de Cl^- activados por Ca^{2+} en al menos algunos epitelios intestinales.

El transporte de electrolitos anormal por los epitelios intestinales fibroquístico puede llevar a una alteración en la composición de los contenidos luminarios. La falta de secreción de Cl^- para contrabalancear los procesos abortivos intestinales puede reducir el contenido de fluidos en la luz intestinal, causando deshidratación e impacto en las heces. De tal manera que estas alteraciones podrían conducir al íleo meconial y las obstrucciones intestinales distales encontradas en pacientes con FQ.

Tracto genital masculino

La observación que la mayoría de los hombres con FQ son estériles y la descripción de cambios histológicos en los epidídimos y vías deferentes, han sugerido que las anomalías en el transporte de iones en estos ductos pueden ocurrir en los fibroquístico. El mecanismo de secreción es probablemente similar al de los epitelios aéreos y los ductos pancreáticos, con un proceso de acumulación de aniones en la membrana basolateral y canales de aniones en la membrana apical.

La disfunción de los canales de Cl⁻ en los pacientes fibroquístico puede resultar en secreciones espesas que llenan los ductos pequeños del tracto genital masculino, produciendo así la patología y esterilidad en los hombres con FQ.

Mecanismos moleculares de disfunción del canal CFTR

La FQ es causada por más de 2000 mutaciones en el gen que codifica para el CFTR, con un amplio rango de severidad de la enfermedad. Se ha hecho una clasificación de las mutaciones en 6 tipos, en base a los mecanismos moleculares y las consecuencias de dicha alteración y que son presentados en la Tabla 20.2 y en la Fig. 20.5.

Tabla 20.2. Clasificación de las mutaciones para CFTR y Terapia disponible

	Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V	Clase VI
Defecto	Síntesis defectuosa	Defecto en el procesamiento o maduración	Regulación defectuosa (no respuesta a AMPc)	Conductancia al Cl ⁻ alterada ↓ transporte de Cl ⁻	Baja abundancia de CFTR, Defecto en <i>splicing</i>	Inestabilidad en membranas post-RE y plasmática
Secuela del defecto	Codón de stop prematuro o defecto en <i>splicing</i>	CFTR mal plegado, degradación prematura	Mutaciones en la apertura del canal	Canal estrecho	No hay transporte de Cl ⁻	Conductancia de otros iones alterada
CFTR funcional	NO	NO	NO	Si	Si	NO
Ej. de mutaciones	G542X W1282X R553X ΔT3950	ΔF508 N1303K	G551D R117H	R334W G314E R347P D1152H	3849+10 kbC→T 2789+5G→A	1811+1.6 kbA→G
Prevalencia en FQ^a	9 %	89 %	4 %	2 %	3 %	desconocido
Tratamiento disponible	Ataluren (PTC-124) gentamicina	Lumacaftor (VX-809) ivacaftor	Ivacaftor (VX-770)	Ivacaftor ^b (VX-770)	Ninguno	Ninguno

Referencias: a porcentaje aproximado de mutaciones CFTR, pero diferentes al 100% dado que varios individuos presentan múltiples mutaciones. b Actualmente bajo investigación. Adaptado de Virant-Young, 2015.

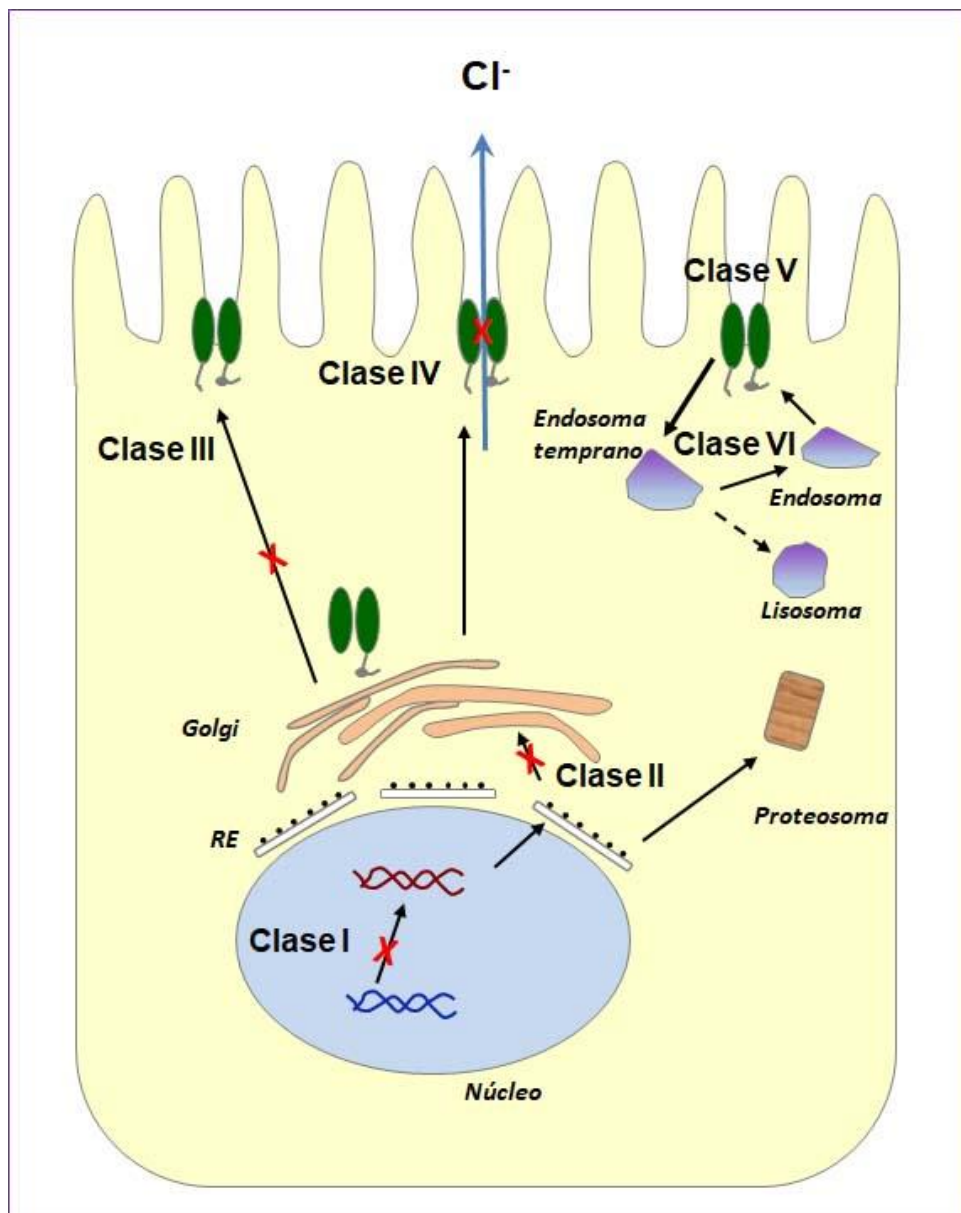


Figura 20.5. Esquema que muestra las distintas clases de mutaciones en la expresión y procesamiento del canal CFTR. Adaptado de Veit et al., 2016.

Mutaciones Clase I: *Producción de proteína defectuosa.*

Incluye mutaciones sin sentido (non-sense) o en el marco de lectura, que introducen un codón de terminación prematuro lo cual lleva a una expresión muy reducida o ausencia de la proteína CFTR.

Mutaciones Clase II: *Procesamiento de la proteína defectuoso.*

Estas mutaciones llevan a un mal plegado y degradación prematura por el sistema de control de calidad del retículo endoplasmático y alteración en la biogénesis de la proteína, reduciendo severamente las moléculas de CFTR que alcanzan la superficie. Varias mutaciones, incluyendo la más común, $\Delta F508$ (p.Phe508del), fallan en el tráfico y así la localización correcta de la proteína. En el caso de la mutación $\Delta F508$ se produce una falla en la maduración de CFTR a una forma completamente glicosilada y después de su producción la proteína mutante parcialmente

glicosilada es degradada. De esta forma la proteína $\Delta F508$ no puede detectarse en la superficie celular, y es localizada erróneamente dentro de la célula.

Mutaciones Clase III: Regulación defectuosa

En esta clase se incluyen las mutaciones que alteran la regulación del CFTR, y que llevan a una apertura anormal del canal, caracterizada por una baja probabilidad de apertura. El funcionamiento normal del CFTR requiere el reconocimiento del ATP y del AMPc para su regulación, se estas mutaciones se localizan en los dominios de unión al ATP (NBD1 y NBD2). Existen proteínas mutantes que no alcanzan la membrana plasmática y tienen alteraciones en los NBDs. La regulación defectuosa de tales mutantes y la resultante disminución en la actividad neta del canal de Cl^- es probablemente responsable del defecto en la permeabilidad al Cl^- epitelial en pacientes que transportan estas mutaciones. Se han reportado también unas pocas mutaciones missense en el exón 13, originalmente definido como el dominio R que regula la fosforilación del CFTR. La mutación missense más común es el cambio de una Gly por Asp en la posición 551 (G551D) de la proteínas CFTR. Los potenciadores que amplifiquen la función iónica y que aumenten el tiempo del canal abierto en la superficie podrían ayudar en estos casos. El Ivacaftor (VX-770, Kalydeco–Vertex Pharmaceuticals), fue aprobado por la FDA como un potenciador del CFTR para este tipo de mutaciones, en pacientes de mayores de 6 años.

Mutaciones Clase IV: Conducción defectuosa

Corresponde a mutaciones en el gen CFTR que alteran la conductancia del canal de Cl^- , impidiendo la generación de un poro iónico conductivo. Se cree que los dominios que expanden la membrana (MSD) contribuyen al poro del canal y se han identificado una serie de mutaciones missense asociadas con FQ en estos dominios. En estos mutante, la regulación de la fosforilación dependientes de PKA y ATP intracelular son normales, pero la cantidad de corriente de Cl^- se halla reducida. En estudios clínicos de fase III, se demostró que para el caso de la mutación R117H, el Ivacaftor mejoraba la función de los canales y la función pulmonar, reducía síntomas respiratorios y aumentaba la ganancia de peso, siendo bien tolerado.

Mutaciones Clase V: Síntesis y función reducida

Las mutaciones en esta clase no cambian la conformación de la proteína pero alteran su abundancia, introduciendo alteraciones en el promotor o sitio de splicing. Este tipo de defectos llevan a un CFTR funcional, pero se produce un defecto en el splicing del ARNm con características fenotípicas variables. La severidad de la enfermedad en los pacientes con este tipo de alteraciones es inversamente proporcional al nivel de transcritos correctamente empalmados. Actualmente hay varios compuestos en investigación que están designados para tratar de aumentar los niveles de expresión del ARNm.

Mutaciones Clase V: Inestabilidad del CFTR en las membranas de RE y plasmática

Esta clase de mutaciones desestabiliza el canal en los compartimentos pos-RE y/o en la membrana plasmática, reduciendo su estabilidad conformacional y/o generando señales de internalización adicionales. La consecuencia de estas alteraciones es que hay un aumento en el recambio o turnover en la membrana plasmática y una disminución en la expresión a nivel de la membrana plasmática apical. En los últimos años también se ha demostrado que defectos en la conductancia de otros iones, pueden llevar a inestabilidad en la conductancia al Cl⁻.

Algunos investigadores proponen que cada individuo con diagnóstico de FQ sea genotipado para determinar que mutación tienen asociada a su enfermedad. De esta forma, se podría categorizar y asociar con un tipo de drogas en particular y así determinar la mejor opción terapéutica y mejorar sus funciones.

Correlaciones genotipo-fenotipo

La presentación de la FQ es compleja, la enfermedad afecta varios órganos y los síntomas varían entre diferentes pacientes. Análisis de una correlaciones genotipo-fenotipo sería valioso para obtener un mejor conocimiento de la función del CFTR y para mejorar el diagnóstico, pronóstico y manejo de los pacientes. En general, las características fenotípicas de la FQ pueden dividirse en tres características.

La primera categoría incluye los síntomas que son comunes a la mayoría, o todos los pacientes con FQ, independientemente del tipo de mutación. Por ej., la anormalidad en la composición de electrolitos del sudor es común a todos los pacientes con FQ clásica. Esto sugiere que el CFTR juega un rol mayor en el transporte de Cl⁻ por los ductos sudoríparos, los niveles de Cl⁻ en el sudor son con frecuencia anormales aun con fenotipos atípicos.

La segunda categoría de características fenotípicas en FQ incluye síntomas que muestran buena correlación con el genotipo, por ej., la función pancreática de los pacientes. Existe una remarcable concordancia de los niveles de función pancreática exócrina entre los miembros de una familia afectada. Así, el fenotipo pancreático (insuficiencia pancreática, IP vs suficiencia pancreática, SP) está determinado primariamente por el genotipo en el locus CFTR.

Una tercera categoría de características fenotípicas incluye los síntomas que no muestran correlación significativa con el genotipo o buena concordancia dentro de una familia. El estado pulmonar de los pacientes con FQ es un buen ejemplo de esta categoría, en la cual la severidad de la enfermedad es afectada por otros factores genético y no-genéticos. También pueden incluirse en esta categoría síntomas como el íleo meconial, pancreatitis, y la enfermedad hepática.

Dado que el 85% de los pacientes fibroquísticos son IP y 15% son SP, puede calcularse que más del 90% de los cromosomas fibroquísticos transportan mutaciones que pertenecen al grupo “severo” (incluyendo $\Delta F508$) y menos del 10% tienen mutaciones que pertenecen al grupo “moderado”. Los pacientes con IP se diagnostican a una edad más temprana, tiene una función pulmonar más pobre y concentraciones de Cl⁻ en el sudor más altas que los pacientes con SP.

Considerando que los pacientes con IP parecen más propensos a desarrollar íleo meconial, se ha propuesto que esta alteración puede ser una variante severa de IP.

Con respecto a la severidad de la enfermedad pulmonar, los intentos para encontrar una correlación genotipo-fenotipo se han visto impedidos por la ausencia de una medida simple de la función pulmonar y por la influencia de otros factores genéticos y del entorno. En general hay una relación inversa entre la función pulmonar y la edad de los pacientes fibroquísticos. Cuando se los separa de acuerdo al estado pancreático, los pacientes con SP generalmente muestran una función pulmonar mucho mejor que los que presentan IP.

Los pacientes con IP presentan dos mutaciones severas. Dado que la clase I y II de mutaciones resultan en ausencia de proteínas en la localización celular correcta, podría esperarse que estas mutaciones tengan un efecto severo sobre la función pancreática. Además, hasta acá todas las mutaciones de clase I y II se hallan asociadas con un fenotipo IP severo. Por el contrario, las mutaciones de las otras resultan en proteínas que son correctamente localizadas, y algunas de estas proteínas retienen significativa actividad residual, aunque otras tienen muy poca actividad medible.

La base de datos CFTR2 se inició para establecer la responsabilidad de una mutación CFTR individual en la expresión de la enfermedad y también para determinar la relación entre mutaciones específicas y los síntomas de FQ. Este proyecto copilo datos clínicos de aproximadamente 40.000 pacientes fibroquísticos y relaciono el fenotipo clínico (estado pancreático, función pulmonar, infección pulmonar) con el fenotipo electrofisiológico (Cl⁻ en el sudor, transporte iónico en células epiteliales transfectadas con el CFTR mutante correspondiente). De todas las mutaciones reportadas (alrededor de 2000), solo 190 se han analizado.

Diagnóstico

El diagnóstico de FQ se basa en criterios clínicos bien definidos y análisis de los niveles de cloruro en el sudor. Cualquiera de las características más importantes de la FQ, si se hallan acompañadas por niveles de cloruro en el sudor mayores de 60 mEq/l o por mutaciones patológicas sobre ambos cromosomas es suficiente para el diagnóstico. Se han identificado una serie de individuos con niveles de cloruro en el rango del diagnóstico pero sin síntomas o historia familiar de FQ, en la medida en que permanezcan asintomáticos, no se pueden diagnosticar como fibroquísticos. Existen otras entidades clínicas en las que los niveles de cloruro en el sudor pueden estar elevados, pero ninguno de esos síndromes se confunde fácilmente con FQ.

Sospecha de FQ:

- Características Fenotípicas:
 - Enfermedad sinopulmonar crónica
 - Anormalidades gastrointestinales o nutricionales
 - Síndrome de pérdida de sal

- Azoospermia
- ó
- Antecedentes de un hermano afectado
- ó
- Resultado positiva en la Pesquisa Neonatal

Criterios para el Diagnóstico de FQ (Confirmatorio)

- Prueba del Sudor anormal en 2 o más ocasiones
- ó
- Presencia de 2 mutaciones en el CFTR causantes de FQ
- ó
- Demostración de diferencia de potencial transepitelial nasal anormal

Existe 1-2% de pacientes con característica clínicas de FQ pero niveles de Cl⁻ normales, para los que se hace el diagnóstico de otra forma. La demostración de azoospermia en hombres sexualmente maduros puede ser de valor. Se puede evaluar la función exócrina pancreática, por ej. los niveles de tripsinógeno sérico pueden ser anormales en 80-85% de los individuos con FQ, pero estos valores solo correlacionan bien con la función pancreática después de los 7 años de edad. Para evaluar a los pacientes atípicos también se podría medir la diferencia de potencial eléctrico a través de los epitelios respiratorios. El análisis de DNA puede ser particularmente útil. El análisis de DNA para 20-30 de las más prevalentes mutaciones de FQ identificará el defecto en alrededor del 90% de los cromosomas asociados con FQ clásica. Hasta que haya mejores alternativas, la prueba del sudor es el estándar diagnóstico.

Prueba del sudor. Se debe realizar bajo condiciones estandarizadas, por personal con experiencia y en centros / laboratorios con buen control de calidad. La prueba consiste en la estimulación de las glándulas sudoríparas mediante iontoforesis con pilocarpina, la recolección del sudor y la cuantificación de la concentración de electrolitos en sudor (cloruro o cloruro y sodio) colectados en gasa o papel de filtro. La tasa de sudoración deber ser superior a 1 g/m²/min, es decir esto equivale a un peso de 75 mg en 30 minutos. Valores de referencia:

- Valores normales: < a 40 mmol/l.
- Valores intermedios o dudosos: 40-60 mmol/l.
- Valores patológicos compatibles con diagnóstico de FQ: > a 60 mmol/l.

Existen una serie de situaciones/patologías que pueden asociarse con elevados electrolitos en el sudor, pero en muchas de estas situaciones (*), la prueba del sudor se normaliza cuando se resuelve la patología de base.

- Fucosidosis
- Glucogenosis del tipo I
- Mucopolisacaridosis

- Hipotiroidismo no tratado*
- Diabetes insípida nefrogénica*
- Insuficiencia adrenal*
- Hipoparatiroidismo familiar*
- Eczema*
- Desnutrición proteico-calórica*
- Displasia ectodérmica
- Infusión de prostaglandina E 1
- Anorexia nerviosa*
- Disfunción autonómica
- Déficit de glucosa 6-fosfatasa
- Síndrome Mauriac
- Pseudo hipoaldosteronismo*
- Colestasis familiar

Pueden encontrarse falsos negativos debido a errores técnicos (baja tasa de sudoración) o en caso de pacientes fibroquísticos: con edema e hipoproteinemia, o en casos de mutaciones asociados con valores de Cl- “dudosos”.

Diagnóstico Molecular. Ya se ha mencionado que hay aproximadamente 2000 mutaciones descriptas, de las cuales la más frecuente a nivel global es $\Delta F508$ (70% de los alelos fibroquísticos). La contribución de las diversas variantes alélicas del gen CFTR a la variabilidad clínica o al grado de afectación se ha evaluado a través de la búsqueda de una correlación genotipo-fenotipo (sección precedente). También hay que considerar que el número e incidencia de las mutaciones que causan FQ depende de la etnia y localización geográfica. Estudios realizados en Argentina mostraron un amplio espectro de alteraciones en el gene CFTR, se han descripto alrededor de 52 mutaciones diferentes, entre las $\square F508$ da cuenta del 58-60% del total (similar al sur Europeo). El análisis conjunto de las mutaciones más frecuentes permite detectar, en promedio, alrededor del 75% de los alelos afectados en nuestra población.

Es importante destacar que, dado que FQ es una enfermedad AR, el resultado de 2 alelos mutados, con mutaciones causantes de FQ, es diagnóstico de certeza. Sin embargo, la no detección de mutaciones no excluye la patología ya que el análisis se basa en la detección de las mutaciones más frecuentes. La muestra puede ser sangre obtenida con EDTA o impregnada en papel de filtro.

Indicaciones para realizar estudio molecular:

- Confirmación del diagnóstico en casos dudosos (valores de cloruros en sudor intermedios o límites).
- Diagnóstico en recién nacidos con patología sugestiva.
- Diagnóstico presintomático en recién nacidos y lactantes con sospecha de FQ por antecedentes familiares o pesquisa neonatal positiva.

- Definición genotípica de los pacientes con FQ confirmada y detección de portadores asintomáticos de la familia, para su adecuado asesoramiento genético.
- Diagnóstico de formas con presentación atípica.
- Diagnóstico prenatal en biopsia de vellosidades coriónicas o amniocentesis.
- Diagnóstico preimplantatorio.

Potencial de membrana: El epitelio respiratorio, incluido el nasal, regula la composición del fluido que baña la superficie de la vía aérea, transportando sodio y cloro. Este transporte activo genera una diferencia de potencial eléctrico transepitelial que puede medirse in vivo. En el epitelio respiratorio fibroquístico se observan una serie de alteraciones (Fig. 20.6):

- La diferencia de potencial (DP) basal es más negativa que en individuos sanos
- La Amilorida induce un cambio mayor en la DP de pacientes con FQ que en sujetos sanos
- La perfusión de la mucosa con un medio libre de Cl^- seguido por un β -agonista no induce cambios en la DP de pacientes fibroquísticos, mientras que en los epitelios sanos se observa un aumento en la DP.

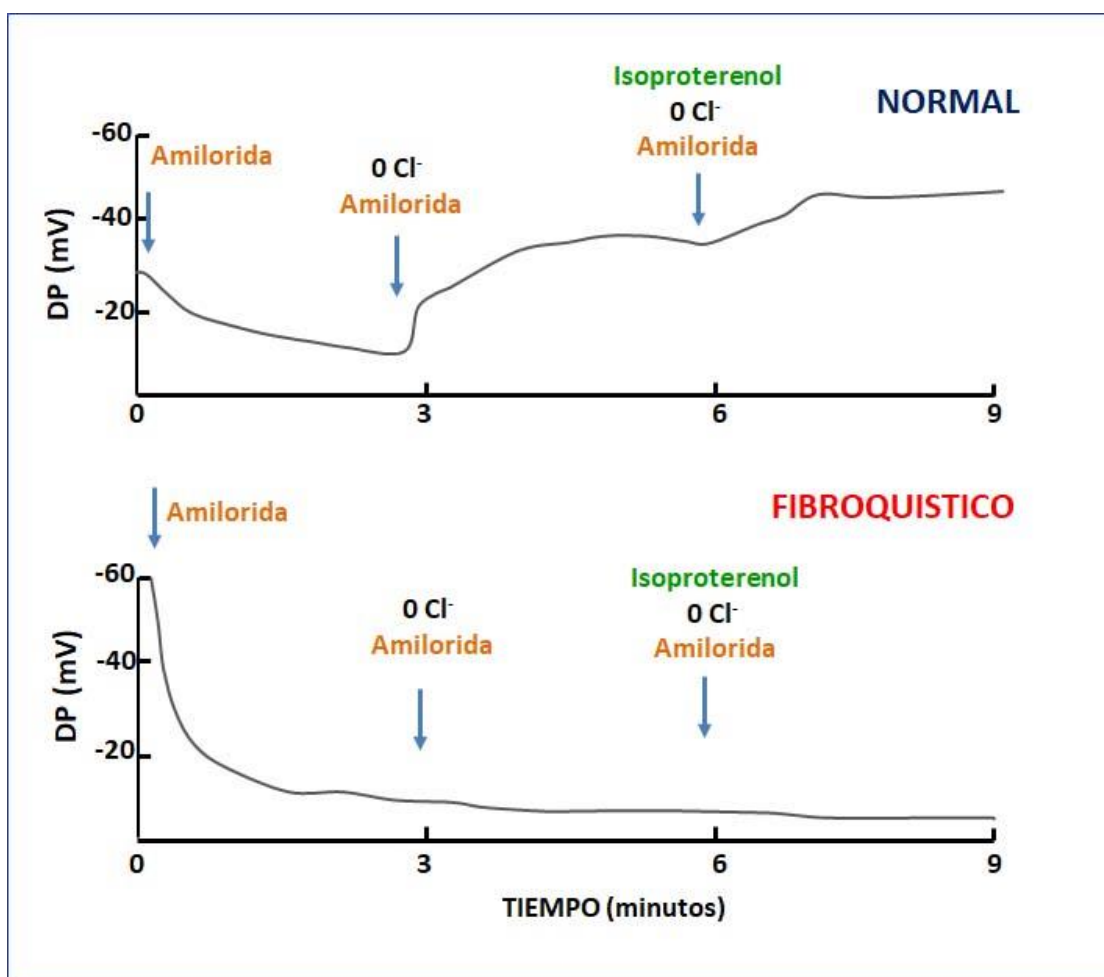


Figura 20.6. Medida de la diferencia de potencial (DP) transmembrana en epitelio nasal de pacientes normales o con FQ. Adaptado de Scriver, 2001.

Pesquisa Neonatal

Actualmente la pesquisa de FQ se ha incluido dentro de los Programas de Detección Neonatal de Enfermedades Congénitas, debido a la evidencia de sus beneficios principalmente sobre el estado nutricional y del crecimiento en los individuos afectados, en conexión con el acceso a un diagnóstico precoz e implementación inmediata de un tratamiento apropiado.

En 1979 se encontró que los recién nacidos con FQ tenían tripsina inmunoreactiva (TIR) elevada en la sangre y que se podría usar la muestra de sangre seca recogida para pesquisa neonatal y usar un radioinmunoensayo para cuantificar la tripsina. Al menos 95% de los pacientes fibroquísticos pueden ser detectados por este método aunque hay falsos negativos. Aproximadamente 1 en 200 individuos analizados requieren repetir la muestra si se usa este método solo, pero el análisis de mutaciones se puede aplicar a las muestras positivas iniciales para aumentar la especificidad sin aun aumento significativo en el costo. La CF tiene un curso altamente variable, desde la muerte en los primeros días de vida causada por complicaciones de íleos meconial o muerte en los primeros meses por problemas severos en el tracto respiratorio a esencialmente una existencia asintomática por 10 a 20 años y prolongada supervivencia.

Estadísticas de la Fundación de CF de USA indica que el 50% de los pacientes se espera que sobrevivan a los 29 años. Múltiples factores determinan el pronóstico para los individuos con CF. Datos de centros de CF en USA sugieren que la supervivencia es mejor para pacientes en los climas del norte comparado con los que viven el sur. En promedio, los hombres viven 2-3 años más que las mujeres. Los individuos de raza negro que sobreviven los primeros años de vida pueden tener un mejor pronóstico que los pacientes blancos. Varios estudios sugieren que las características clínicas a la presentación hacen una diferencia. Los pacientes que presentan solamente esteatorrea y falla para crecer generalmente mejoran remarcablemente con el tratamiento lo hacen bien por largos períodos. Por otro lado, los pacientes que presentan síntomas del tracto respiratorio, usualmente continúan con manifestaciones del tracto respiratorio, función pulmonar más anormal y un pronóstico menos favorable. En la población general de CF, los pacientes con suficiencia pancreática muestran un progreso más lento de la enfermedad pulmonar. Debidos a que el progreso de la enfermedad pulmonar no correlaciona con el genotipo, la longevidad tampoco se halla ligada al genotipo. Finalmente, factores psicosociales juegan un rol importante. El role del soporte familiar es crucial.

Estrategias para la Pesquisa Neonatal de FQ (según el Consenso Nacional de FQ 2008): se utilizan muestras de sangre impregnada en papel de filtro y se realiza en primera instancia la determinación de la TIR. Si la determinación de TIR da anormal se plantean dos alternativas, que se presentan en las Fig. 20.7 y 20.8.

1. Recolección de una 2da muestra antes del 1 mes de vida para realizar una segunda determinación de TIR. Si luego de la 2da muestra los resultados de TIR son elevados, se puede confirmar con la prueba del sudor o realizar un estudio molecular para demostrar (o no) la presencia de dos mutaciones asociadas con FQ, en caso positivo, confirma el diagnóstico de FQ.

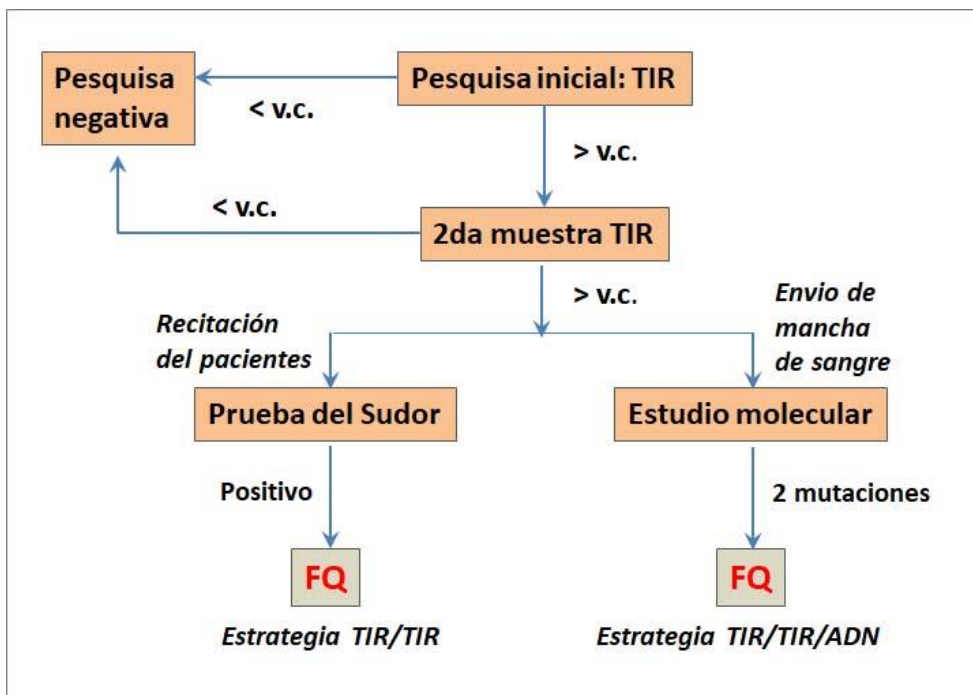


Figura 20.7. Estrategia para la pesquisa neonatal de FQ, basada en la recolección de una segunda muestra de sangre impregnada en papel de filtro, para una 2da determinación de TIR (tripsina inmunoreactiva). V.C., valor de corte. Adaptado del Consenso Nacional de FQ, 2008.

- Realización de estudios moleculares sobre la misma muestra recolectada para la prueba inicial. Si los estudios moleculares no son concluyentes, se cita al paciente para realizar la prueba del sudor o se toma una segunda muestra para otra prueba TIR y se procede como en la estrategia anterior.

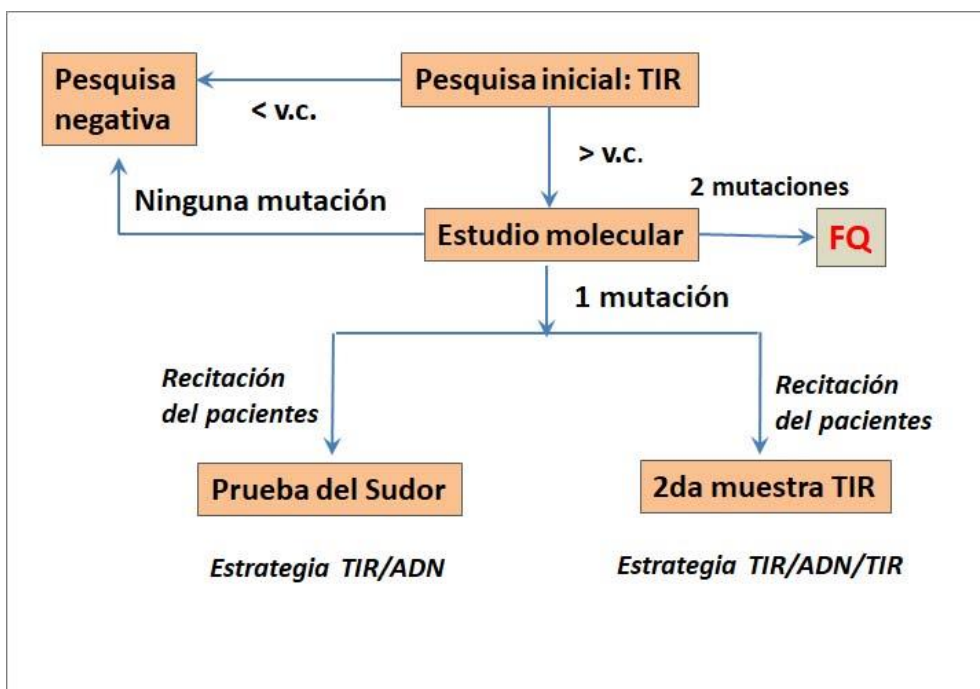


Figura 20.8. Estrategia para la pesquisa neonatal de FQ, basada en la determinación de estudios moleculares sobre la misma muestra inicial de sangre impregnada en papel de filtro. TIR (tripsina inmunoreactiva). V.C., valor de corte. Adaptado del Consenso Nacional de FQ, 2008.

La Fundación de FQ Americana convocó a un comité internacional de expertos en el diagnóstico de FQ para actualizar una guía diagnóstica y llegar a una estandarización de definiciones mundiales. Se estableció una guía de consenso sobre el diagnóstico de FQ y otras condiciones asociadas con mutaciones en el CFTR. En la Fig. 20.9 se presenta un algoritmo para establecer el diagnóstico de FQ, basado en descubrimientos clínicos y pruebas de laboratorio.

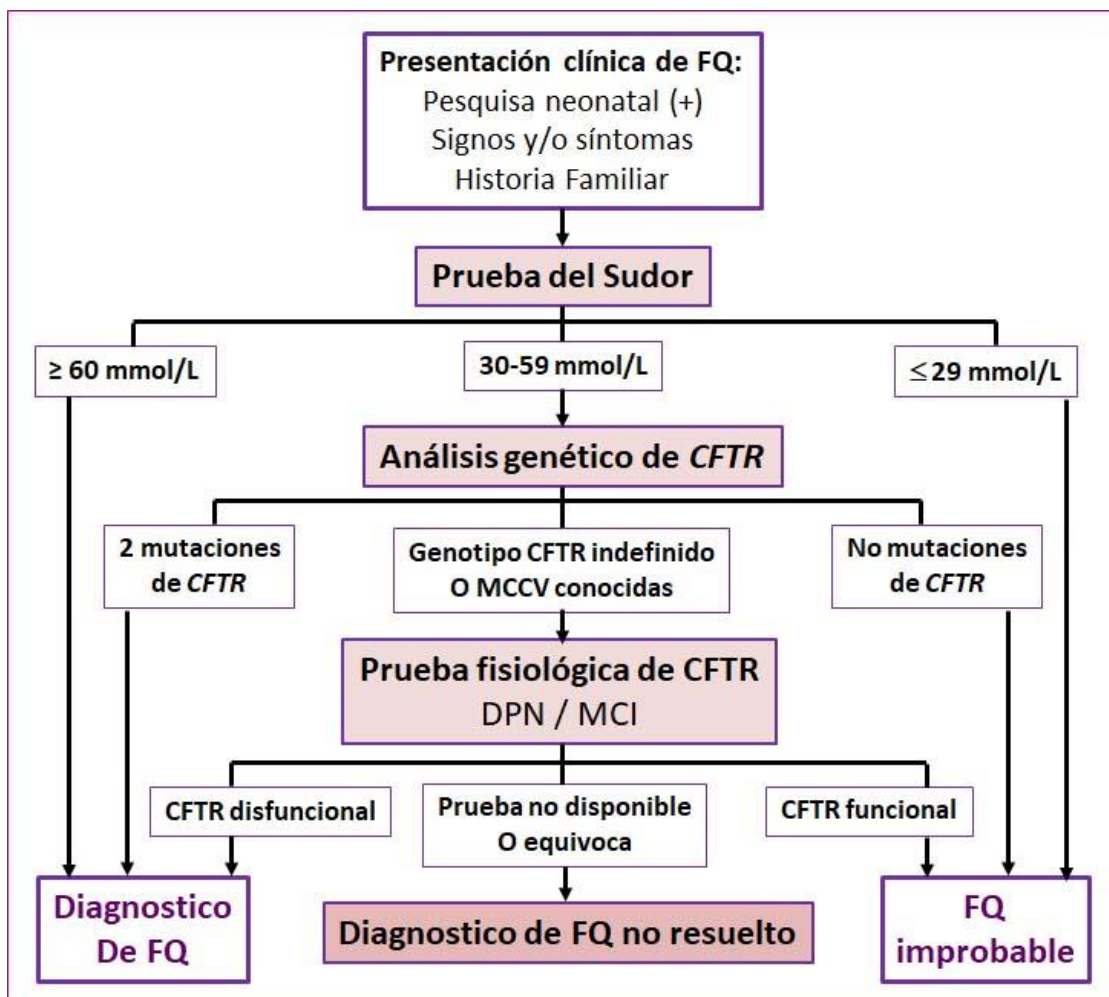


Figura 20.9. Algoritmo para el diagnóstico de FQ. MCCV, mutaciones de consecuencias clínicas variables; DPN, diferencia de potencial nasal; MCI, medida de la corriente intestinal. Adaptado de Farrell, 2017.

Aunque los individuos entran en este algoritmo después de una prueba de Pesquisa positiva, en la cual también el análisis genético de CFTR se ha realizado, el diagnóstico de FQ se basa en la demostración directa de un CFTR no funcional a través de la determinación de CI- en el sudor.

Tratamiento

Los objetivos primarios del tratamiento de la FQ están dirigidos a preservar y/o corregir la disfunción de órganos y aliviar los síntomas.

Cuidado Ambulatorio: Al diagnóstico la mayoría de los pacientes entran en un programa de cuidado que incluye drenaje postural con percusión del tórax, administración de antimicrobianos y un régimen nutricional que incluye enzimas pancreáticas y vitaminas solubles en grasas.

El drenaje postural con percusión de tórax se basa en que la tos limpia el mucus de las vías aéreas superiores pero se necesita vibración para remover las secreciones de las vías aéreas inferiores, donde la velocidad de flujo espiratorio es baja. La mayoría de los centros prescriben este tratamiento 1 a 4 veces al día, dependiendo de la severidad de la enfermedad.

Respecto a los Antimicrobianos, la infección pulmonar es la fuente más importante de morbilidad y mortalidad de la FQ, de tal manera que el tratamiento con antibióticos está destinado a controlar la progresión de la enfermedad. Se basa en la presencia de síntomas y la identificación de organismos del tracto respiratorio inferior. Las dosis usadas deben ser mucho más altas que para otras infecciones respiratorias no-FQ, con tratamientos más prolongado con antibióticos. Debido a que el tratamiento para *Pseudomonas* con antibióticos orales con frecuencia no es efectivo, se dan preparaciones de aminoglicósidos u otros antibióticos en preparaciones en aerosoles. Algunos tratamientos se realizan usando aerosoles, los que tienen por objeto proveer agua para hidratar las secreciones de mucus concentrado. También se han dado DNasa recombinante humana en pacientes con moderada enfermedad pulmonar supurativa. Este tratamiento se basa en que la lisis de células polimorfonucleadas contribuye con su DNA viscoso a las secreciones aéreas de los FQ. En pacientes con labilidad bronquial se usan broncodilatadores, particularmente β -adrenérgicos, siendo la ruta por aerosoles claramente superior.

Existen otras terapias respiratorias. Se han usado mucolíticos, expectorantes, y supresores de la tos, para aliviar los síntomas pulmonares. En general la tos es un importante mecanismo de clearance del mucus en pacientes FQ y no debe suprimirse. Los mucolíticos como N-acetilcisteína son injuriosos al epitelio respiratorio y regularmente promueven bronquitis. El ejercicio se considera beneficioso para los pacientes fibroquísticos. La Amilorida en aerosol se usa para bloquear la excesiva reabsorción de Na y UTP en aerosol para aumentar la secreción de cloruro por los epitelios aéreos de fibroquísticos. Estos dos últimos agentes pueden ser particularmente efectivos en combinación para incrementar las sales y agua dentro del lumen aéreo.

Tratamientos Nutricionales: Aproximadamente el 90% de los pacientes con FQ requieren suplemento de enzimas pancreáticas, administradas como microesferas encapsuladas cubiertas con un material resistente a ácidos, para promover su liberación en el intestino delgado. Una administración adecuada de carotenoides y vitamina E se cree que combaten el estrés oxidativo impuesto por la infección pulmonar crónica. Varios individuos con FQ tienen una necesidad calórica superior al normal debido al mayor trabajo respiratorio, puede haber pérdida de peso y se considera útil una dieta alta en calorías. Los pacientes CF que retienen la función pancreática exócrina y mantienen una buena nutrición experimentan una disminución más lenta en la función pulmonar que los con insuficiencia pancreática.

Sales y agua. Durante las estaciones cálidas, los niños requieren extra sales, se debe imponer el consumo de líquidos a los niños ya que son incapaces de generar un estímulo de fluido corporal hiperosmolar por sed.

Factores sicosociales. Como con cualquier enfermedad crónica, la respuesta global depende de la actitud del paciente.

Tratamiento de las Complicaciones

Respiratorias: Las complicaciones más temidas de la enfermedad pulmonar fibroquística son la hipertensión pulmonar con falla cardíaca derecha y falla respiratoria. En estos casos, la mejor estrategia es mejorar la oxigenación a través de una terapia pulmonar intensiva. La falla respiratoria se maneja mejor con una vigorosa terapia médica de la enfermedad pulmonar. La ventilación asistida es recomendada solo en algunos casos y antes del trasplante pulmonar. Otras complicaciones a ser tratadas adecuadamente son atelectasia, neumotórax, aspergilliosis alérgica, hemoptisis, osteoartropatía hipertrófica y reflujo gastrointestinal.

Gastrointestinales. El íleo meconial puede aliviarse a veces con enemas de materiales de contraste, si esto falla, se requiere cirugía. La cirrosis usualmente es focal y no requiere una terapia específica. La falla hepática y ascitis se tratan como en otros pacientes., al igual que la pancreatitis. La hiperglucemia sostenida requiere un tratamiento con insulina.

Terapia Quirúrgica. La razón más común para la cirugía en la FQ es la polipectomía nasal. Los pólipos tienden a recurrir después de la cirugía, pero la incidencia de pólipos es en la segunda década. Ocasionalmente se debe indicar una cirugía abdominal por obstrucciones intestinales, apendicitis, o coleditiasis, la que suele ser bien tolerada si se cuida el pulmón. El trasplante de corazón-pulmón o doble pulmón se ha intentado en varios centros, el epitelio pulmonar trasplantado retiene las propiedades electroquímicas del tejido pulmonar normal y no hay problemas por infecciones, sin embargo, puede haber complicaciones por el rechazo del pulmón.

Estrategias terapéuticas basadas en la mutación del CFTR

El conocimiento de las mutaciones que afectan el CFTR ha llevado a los investigadores a enfocarse en el desarrollo de drogas para el tratamiento de la FQ basadas en la causa molecular subyacente en la FQ. Estas drogas incluyen moléculas que leen por encima de un codón de terminación prematuro, moléculas potenciadoras o moléculas correctoras.

- **Potenciadores:** para mutaciones clase III y IV. Aumentan la función de CFTR expresado en la superficie de células epiteliales. Ivacaftor.

- Correctores: para mutaciones clase II. Mejora el procesamiento intracelular y liberación de CFTR mutantes en la superficie celular. Lumacaftor.
- Correctores de la Producción: para clase I Aumentan la fabricación del CFTR. Promueven la lectura a través de codones de terminación prematuros que llevarían a un CFTR truncado. Ataluren

Referencias

- Consenso Nacional de Fibrosis Quística. Arch Argent Pediatr 2008; (Supl) 106(5):e01-52.
- Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. Int J Biochem Cell Biol. 2014; 52:94-102.
- Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. J Pediatr. 2017; 181S:S4-S15.e1.
- Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.; Childs, B.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. The Metabolic and Molecular base of inherited disease. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 8th edition (2001).
- Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, Hong JS, Pollard HB, Guggino WB, Balch WE, Skach WR, Cutting GR, Frizzell RA, Sheppard DN, Cyr DM, Sorscher EJ, Brodsky JL, Lukacs GL. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. Mol Biol Cell. 2016; 27(3):424-33.
- Virant-Young D, Thomas J, Woiderski S, Powers M, Carlier J, McCarty J, Kupchick T, Larder A. Cystic Fibrosis: A Novel Pharmacologic Approach to Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Modulation Therapy. J Am Osteopath Assoc. 2015; 115(9):546-55.
- Wiencek JR and Lo SF. Advances in the Diagnosis and Management of Cystic Fibrosis in the Genomic Era. Clinical Chemistry 2018; 64(6) 898–908.

CAPÍTULO 21

Osteopatias hereditarias. Hipofosfatasa - osteogenesis imperfecta

Juan Manuel Fernández y Ana M Cortizo

Hipofosfatasa

Introducción al tejido óseo

El esqueleto está formado por huesos, cartílagos, ligamentos y tendones; mientras que los huesos constituyen la parte mineralizada, el resto dan origen a tejidos no mineralizados.

El esqueleto cumple varias funciones,

- ✓ Sirve de soporte estructural para el resto del cuerpo
- ✓ Protege órganos y estructuras vitales internas; tales como la caja torácica, cráneo o por ejemplo, las vertebrae, las cuales protegen a la medula espinal
- ✓ Constituyen una base mecánica para el movimiento: en los distintos huesos se insertan los músculos para que los mismos puedan ejercer palanca al contraerse.
- ✓ Mantienen la homeostasis mineral, a través del depósito de distintos iones y el equilibrio ácido base.
- ✓ Proveen un microambiente para la hematopoyesis: en la medula ósea se encuentran las células madre hematopoyéticas de las cuales derivan todas las células sanguíneas.

El esqueleto está formado por 206 huesos los cuales podrían clasificarse según su forma en largos, planos, irregulares y cortos. También se los clasifica según su estructura en: huesos trabecular (también llamado esponjoso) y cortical (o compacto). Ambos están formados por la misma matriz extracelular; la diferencia entre ellos radica en que el hueso trabecular está formado por estructuras llamadas trabéculas, mientras que el cortical forma una estructura más densa (Fig 21.1). Además, el sistema trabecular se encuentra en el interior de los huesos mientras que el hueso cortical se encuentra en la superficie.

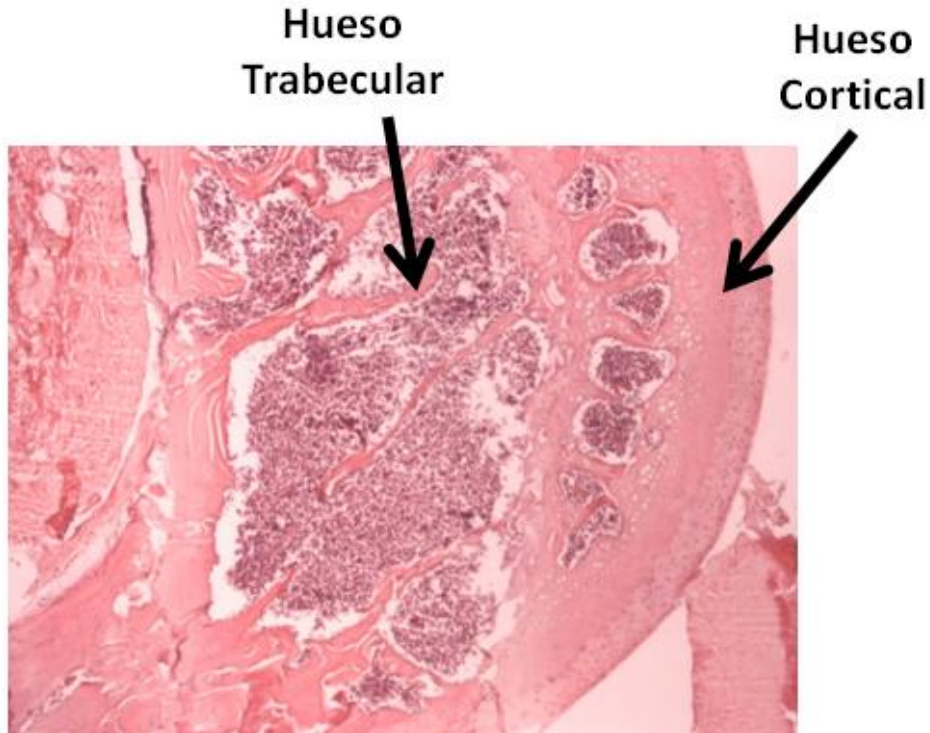


Figura 21.1. Corte de cabeza de fémur de rata teñido con Hematoxilina y Eosina donde puede verse el hueso cortical y trabecular.

Más allá del hueso observado, todos poseen ambos tipos de hueso pero en diferentes proporciones. Por ejemplo, los cuerpos vertebrales poseen un alto contenido de hueso trabéculas, mientras que en el caso de un hueso largo, el porcentaje de trabéculas o hueso cortical dependerá de que sección se observe.

El tejido óseo se define como un tejido conectivo mineralizado el cual posee una matriz extracelular proteica, básicamente colágeno tipo 1 con cristales de minerales análogos a la hidroxiapatita mineral.

Varios tipos celulares intervienen en el metabolismo óseo. Una de ellas son los osteoblastos, los cuales provienen de las células madres mesenquimáticas. Estas se diferencian a osteoblastos para producir en una primera instancia una matriz extracelular rica en colágeno tipo 1 no mineralizada, llamada osteoide y luego los cristales de hidroxiapatita los cuales serán depositados sobre la matriz colagenosa (Fig 21.2).

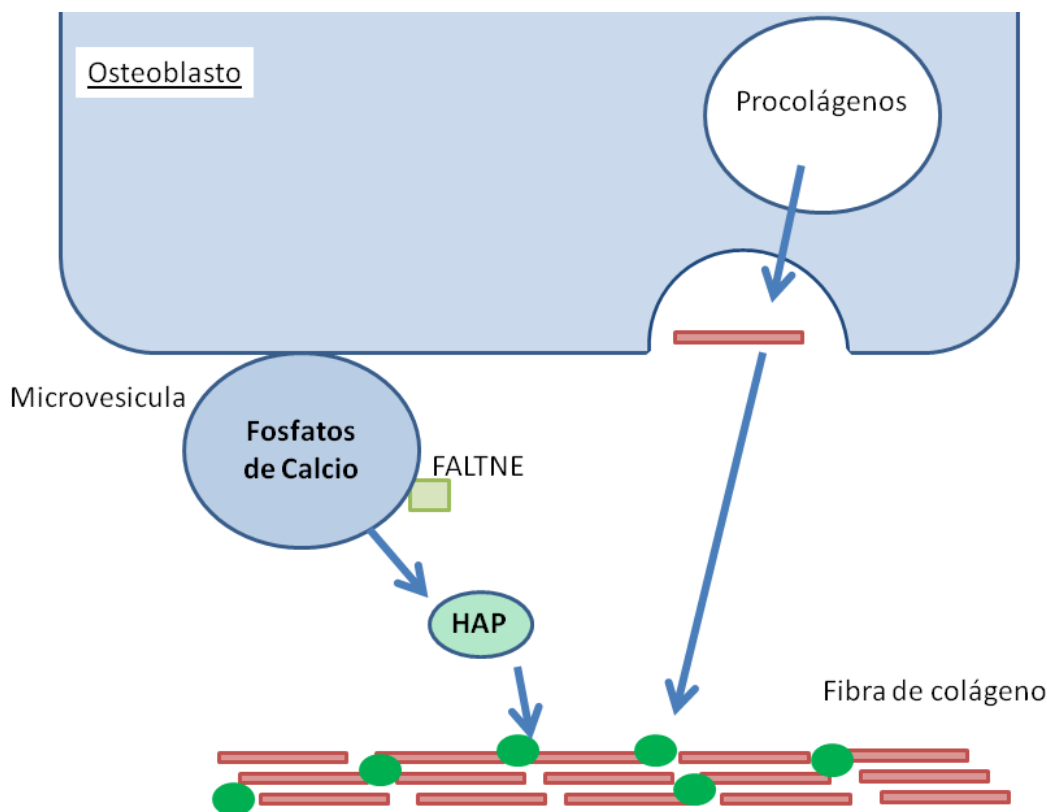


Figura 21.2. El osteoblasto genera la fibra de colágeno para luego mineralizarla a través de la síntesis de hidroxipatita (HAP). HAP se produce luego de la maduración de la síntesis de distintas sales de fosfato de calcio producida dentro de microvesículas formadas en la superficie de las células. Estas microvesículas viajan hasta la matriz extracelular rompiéndose y liberando la HAP sobre las fibras de colágeno. FALTNE, fosfatasa alcalina tejida no específica.

Una enzima involucrada en la producción de cristales de hidroxipatita, el cual es el componente mineral de la matriz extracelular del hueso y dientes, es la enzima Fosfatasa Alcalina Tejido no específico. Mutaciones en esta enzima produce una enfermedad llamada Hipofosfatasa, la cual veremos a continuación.

Fosfatasa Alcalina tejido no específico

Las fosfatasas alcalinas constituyen un conjunto de enzimas que hidrolizan fosfoesteres. Estas enzimas provienen de un gen ancestral común (Fig. 21.3) el cual se cree que evolucionó dando origen a 4 genes distintos que codifican para cuatro fosfatasas alcalinas: Fosfatasa Alcalina Germinal, Fosfatasa Alcalina Intestinal, Fosfatasa Alcalina Intestinal y Fosfatasa Alcalina tejido no específico. Estas cuatro enzimas resultan ser isoenzima, es decir, productos de distintos genes, con diferentes secuencias de aminoácidos que pueden catalizar la misma reacción, en este caso, la hidrólisis de fosfoesteres con un pH óptimo alcalino. En cuanto a la Fosfatasa Alcalina tejido no específico (FALTNE), solo mutación en este gen (y no en las otras fosfatasas alcalina) produce Hipofosfatasa. Una característica del gen de la FALTNE es que a partir de los transcritos podemos tener diferentes isoformas. Estas se definen como productos del mismo

gen pero que sufren modificaciones pos traduccionales. En el caso de la FATNE, estas modificaciones consisten en procesos de glicosilación. Estas glicosilaciones son específica de cada tejido, así, la FATNE ósea (proveniente de los osteoblastos) tiene una secuencia de glicosilación característica a tejido óseo, pero distinta a la FATNE hepática, la cual a su vez posee una secuencia característica pero distinta a la renal, etc. De esta forma, la FATNE es una familia de enzimas con la misma secuencia de aminoácidos, debido a que proviene del mismo gen, que se expresa en todos los órganos pero que posee una secuencia de glicosilación característica y específica de cada tejido.

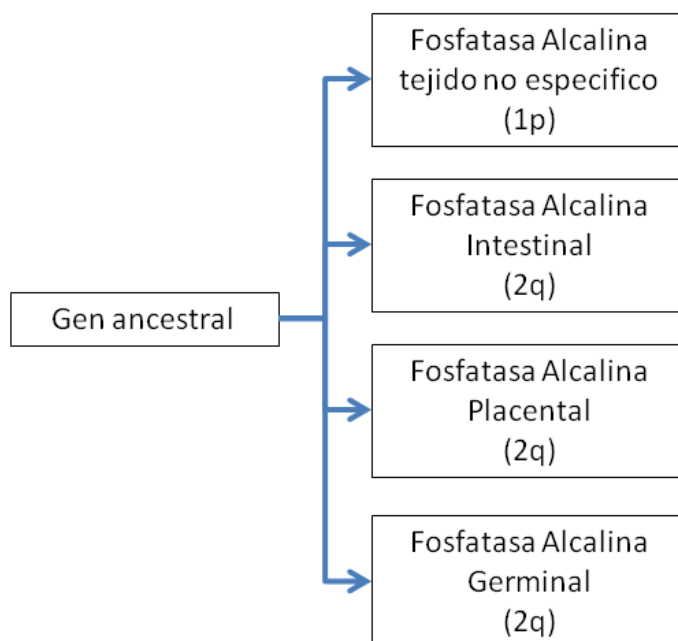


Figura 21.3. Las cuatro isoenzimas de la fosfatasa alcalina provienen de 4 genes distintos. El gen de la Fosfatasa Alcalina Tejido No Especifico se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 1 mientras que los genes de la Fosfatasa Alcalina Intestinal, Germinal y Placentar se encuentran en el brazo corto del cromosoma 2 con una alta homología entre ellos 3.

La FATNE es una ectoenzima, es decir es una enzima anclada a la membrana plasmática, con un sitio activo extracelular (Fig 21.4A). Se encuentra unida a la membrana por un sistema de fosfatidilinositolglicano y forma tetrámeros y dímeros, pero son los primeros los que constituyen la estructura biológicamente activa o funcional. El sitio activo de esta enzima posee dos átomos de Zn^{+2} que le ayuda a estabilizar la estructura y un átomo de Mg^{+2} que actúa como un cofactor.

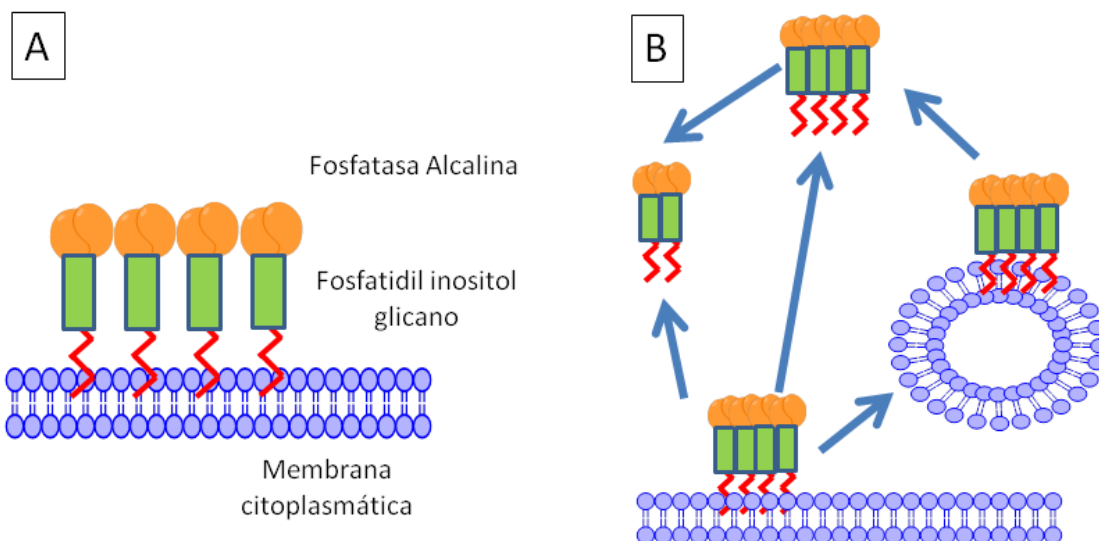


Figura 21.4. La enzima Fosfatasa Alcalina se encuentra anclada en la membrana citoplasmática en el espacio extracelular mediante el sistema fosfatidilinositol glicano (A). Sin embargo, algunas formas de la enzima pueden encontrarse en circulación (B). (Imagen adaptada de Van Hoof 1994)

No obstante, en circulación se pueda hallar en varias formas (Fig 21.4B), por ejemplo la forma de tetrámero o de dímeros con su sistema de anclaje o en vesículas. Sin embargo, estas formas circulantes no poseen actividad in vivo. A pesar de ello, en el laboratorio es posible medir la actividad de la fosfatasa alcalina circulante, aunque solo representan alrededor del 5% del total de FATNE. Para ello, se han diseñado varios métodos, tales como métodos electroforético, iso-electroenfoque, cromatografía líquida o HPLC, métodos inmunoquímicos. Es también posible medir la actividad enzimática mediante la formación del sustrato degradado a través de una medida espectrofotométrica. Estos métodos no solo nos permiten evaluar la actividad de la fosfatasa alcalina, sino que también es posible conocer la composición en sangre de las distintas isoformas e isoenzimas que componen la actividad total. La tabla 21.1 muestra la composición típica de la enzima fosfatasa alcalina total en sangre en individuos adultos y en niños en diferentes estados de crecimiento.

Tabla 21.1

Estado	Origen		
	Hígado	Hueso	Intestino
Adulto	45%	45%	10%
En crecimiento	20%	75%	5%

En la tabla anterior se puede observar como del total de la actividad de FAL en sangre, el 90% corresponde a la isoenzima FATNE y el restante porcentaje corresponde a la isoenzima intestinal. Del total de actividad de FATNE, aproximadamente la mitad corresponde a la isoforma hepática y la otra mitad a la isoforma ósea y un bajo componente de la intestinal. Sin embargo,

durante la etapa de crecimiento, el esqueleto del acompaña el crecimiento, la actividad osteoblástica aumenta y eso hace que aumente la actividad de la enzima FATNE ósea. Esto se refleja en altos valores de FAL total en sangre, con mayor proporción en la isoenzima ósea.

Hipofosfatasa. Clasificación y características clínicas

La hipofosfatasa se define como una enfermedad hereditaria, rara, caracterizada por defectos en la mineralización del esqueleto y/o dentición, debida a un defecto en la Fosfatasa Alcalina Tejido No específica.

Recorriendo un poco la historia de esta enfermedad, la enzima fue descrita por primera vez por Robert Robison en 1923, el cual observó actividad de fosfatasa en cartilago y hueso durante el proceso de osificación de ratas y conejos jóvenes. Rápidamente, observó el importante rol de esta enzima en la mineralización esquelética, hidrolizando esteres fosfóricos. Utilizando ensayos in vitro demostró que esta enzima posee un pH óptimo alcalino y además pudo encontrarla presente en otros tejidos que no mineralizan la matriz extracelular. En 1948 J.C. Rathbun acuñó el término hipofosfatasa cuando describió un niño que desarrolló y murió de un cuadro de raquitismo grave, con pérdida de peso y convulsiones, pero con bajos niveles de actividad de fosfatasa alcalina en suero, huesos y otros tejidos. En 1955 se describió un aumento en los niveles de fosfoetanolamina (PEA) en pacientes con esta patología, demostrando que PEA seria unos de los sustratos naturales de la FATNE. En el año 1957, se estimó que la incidencia de la hipofosfatasa seria de 1 en 100.000 nacidos vivos, sin embargo la incidencia actual no se conoce. Entre los años 1965 y 1971 se describe un aumento en los niveles en sangre y orina de pirofosfato inorgánico (PPi) en los pacientes con hipofosfatasa y en 1985, se descubre que se encuentran elevados los niveles de piridoxal 5'fostato (PLP) en sangre. Hasta ahora, se ha demostrado que estos tres sustratos (PEA, PPi, PLP) serian los sustratos naturales de la enzima (Fig. 21.5), acumulándose en el organismo cuando hay deficiencia enzimática. En 1988 y en 1990 se logra secuenciar el gen y se descubre el primer defecto molecular.

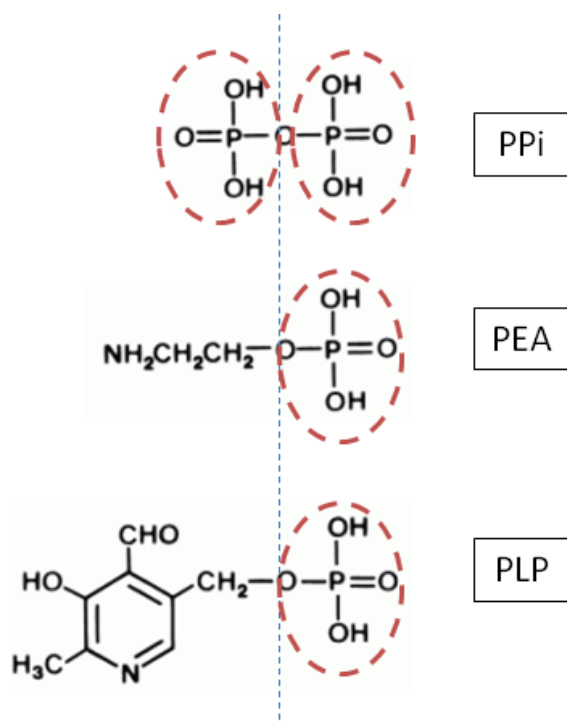


Figura 21.5. Sustratos de la enzima FALTN. Estos fosfoesteres son clivados (línea azul) por la enzima liberando los grupos fosfóricos.

Actualmente, se han detectado más de 350 mutaciones del gen de la enzima FALTN, alrededor del 80% son mutaciones del tipo missense. Estas mutaciones producen hipofosfatasa siendo la mayoría de los casos asociados a formas clínicas graves. La actividad de las otras fosfatasa alcalinas (intestinal, germinal y placentar) se encuentran dentro de rangos normales debido a que son codificadas por otros genes (Fig 25.3).

Si bien, la FALTN se halla en todos los tejidos, mutaciones en esta enzima solo produce alteraciones en el tejido óseo y/o dental, produciendo manifestaciones clínicas altamente variables. En base a la edad de expresión la hipofosfatasa se puede clasificar en: Perinatal, Infantil, de la niñez, Adulta, Odontohipofosfatasa y Pseudohipofosfatasa. A pesar de esta clasificación, cabe mencionar que las manifestaciones clínicas son un continuo y dependen de la actividad residual de la enzima.

En cuanto a la herencia, las formas severas resultan ser autosómicas recesivas mientras que las formas moderadas y leves son autosómicas recesivas o dominantes.

Hipofosfatasa Perinatal. Es la forma más grave de las manifestaciones, con expresión en útero y letal, la gran mayoría de estos pacientes fallecen antes de nacer. Durante el embarazo, la complicación más frecuente es hidramnios. Cursa con falta de osificación ósea a nivel de los huesos del cráneo, vertebras y costillas. En caso de nacer, sobreviven muy poco tiempo. Nacen con huesos cortos, deformados y con torax raquíctico. Se observa compromiso respiratorio debido a alteraciones en la caja torácica. Suelen poseer pulmones hipoplásicos debido a la falta de surfactantes, por lo que se ha postulado la necesidad de la enzima para poder generarlos. Hay

dificultad en ganar peso, apnea periódica con cianosis, bradicardia y hemorragia intracraneal debido a malformaciones en los huesos del cráneo.

Hipofosfatasa Infantil. En este caso, la mortalidad en útero es menor a la forma perinatal, de hecho, la tasa de mortalidad es del 50%. Aquellos que logran nacer, los primeros signos clínicos suelen aparecer alrededor de los 6 meses de vida. Presentan dificultad en la alimentación y ganancia de peso, craneosinostosis funcional, suturas craneanas ensanchadas y braquicefalia, lo cual llevara a que posean un aumento de la presión intracraneal. Presentan además alteraciones en la fontanela anterior, hipertelorismo óptico y escleras azules. Debido a que no presentan una correcta mineralización del hueso, se observa hipercalcemia e hipercalciuria lo que producirá nefrocalcinosis, llevando a compromiso renal. En estos pacientes se detecta una caja torácica pobremente desarrollada, de apariencia raquíctica, lo que los hace susceptibles a fracturas de costillas, llevando a un fenómeno llamado “flail chest” o respiración paradójica, asociado a una mala circulación de aire, que a su vez se asocia con neumonías. En cuanto a estudios de imágenes, como radiografías, se puede observar que la diáfisis de los huesos largos es normal, pero las metástasis se encuentran pobremente mineralizadas. Aquellos pacientes que logran sobrevivir, pueden presentar una mejora espontánea de los huesos, con remisión clínica a excepción de la craneosinostosis y la braquicefalia. Los pacientes presentan baja estatura y pérdida temprana de los dientes de leche.

Hipofosfatasa de la niñez. Esta forma de hipofosfatasa puede ser confundida con raquitismo, presentando una manifestación clínica muy variable. Poseen pérdida de los dientes deciduos en forma prematura antes de los 4 años por aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental, además, pueden tener repetidas infecciones dentales producida por destrucción parcial del cemento dental. En cuanto a los dientes permanentes, suelen tener mejor pronóstico. Debido a la falta de desarrollo esquelético, los pacientes presentan baja estatura, retardo en el comienzo a caminar y las piernas combadas hacia fuera o hacia adentro de tal forma que pueden incluso tocarse las rodillas. Pueden presentar ensanchamientos de las suturas craneales, braquicefalia y craneosinostosis. Suelen tener alargamiento de las muñecas, rodillas y/o tobillos y episodios de dolor en las articulaciones debido a la formación de cristales de pirofosfato de calcio. El incorrecto desarrollo óseo, hace que los músculos no puedan insertarse en los huesos en forma correcta haciendo que haya dolor y debilidad muscular. En cuanto a las radiografías, se pueden observar en los huesos largos unas lenguas radioluscentes que son proyectadas desde el plato de crecimiento hacia la metafisis.

Hipofosfatasa de la adultez. En este caso, los síntomas suelen aparecer a una edad aproximada de 40 años. Examinando la historia clínica de estos pacientes, solo padecieron signos de raquitismo y/o pérdida temprana de los dientes deciduos, luego, siempre tuvieron buena salud. En la edad adulta se puede confundir la sintomatología como osteomalacia. Estos pacientes suelen tener pobre reparación de los metatarsos fracturados por stress durante el apoyo de los

pies, pudiendo tener varios tarsos fracturados y mal reparados al mismo tiempo. Suelen tener dolor y disconformidad, debido a pseudofracturas. Además, pueden presentar degradación de los cartílagos y artropatías debido a la formación de cristales de pirofosfato de calcio. Debido a los metatarsos fracturados, a las pseudofracturas y a la degradación de los cartílagos, estos pacientes suelen jubilarse antes de término por discapacidad. Puede diagnosticarse osteopenia y pérdida temprana de los dientes permanentes. Si se realizara un screening familiar a estos pacientes, existen altas chances de que se encuentre parientes con algunas de las manifestaciones clínicas descriptas.

Odontohipofosfatasa. En este caso, los pacientes solo manifiestan alteraciones dentales, sin manifestaciones en el esqueleto, sin signos ni de raquitismo ni de osteomalacia. Se caracteriza por la pérdida temprana de los dientes debido a una prematura exfoliación y/o caries severas. En cuanto a los marcadores bioquímicos, son indistinguibles de las forma leves.

Pseudohipofosfatasa. Es una forma muy rara de hipofosfatasa. La clínica y los estudios radiográficos son indistinguibles de la forma infantil observando en el laboratorio los niveles de los fosfocompuestos (PEA; PLP y PPI) elevados, pero a diferencia de los anteriores, al analizar la actividad de la fosfatasa alcalina, esta presenta una actividad dentro del rango control. Esto se debe a que existen algunas mutaciones que hacen que en condiciones fisiológicas, la enzima no tenga actividad, pero en condiciones in vitro del ensayo de laboratorio (pH alcalino, concentración de sustrato saturante y sustrato por el cual la enzima poseen mayor afinidad que por los naturales) pueda medirse la actividad de la enzima dentro de rangos normales.

Diagnostico

El diagnóstico se basa en la clínica, estudios radiográficos y laboratorio. En el laboratorio de análisis clínicos se puede evaluar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina total y su composición (distintas isoformas e isoenzimas). En los pacientes con hipofosfatasa se encuentran disminuidos los niveles de fosfatasa alcalina en sangre, sin embargo, debido a que los niveles totales de FAL depende del la edad de los individuos, existen dos rangos de referencias: para niños y para adultos (Fig 21.6). En cuanto a la muestra, se debe utilizar suero o plasma con heparina ya que el uso de EDTA o citrato como anticoagulante puede resultar en falsos negativos debido a sus propiedades quelantes de cationes divalentes. La determinación de la actividad de FAL en sangre puede servir de diagnóstico diferencial de hipofosfatasa y raquitismo u osteomalacia, en estas dos últimas situaciones, los niveles de FAL se encuentran dentro del rango normal. En los casos de las formas perinatal o infantil, se puede determinar la actividad enzimática a partir de muestras de sangre el cordón umbilical.

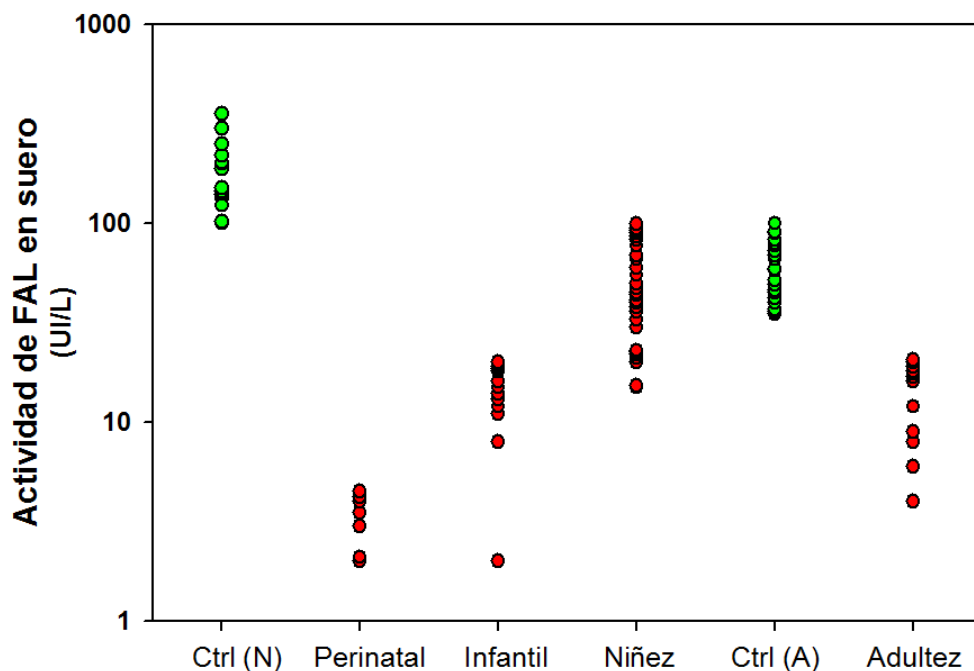


Figura 21.6. Niveles de actividad de FAL total en sangre en las distintas hipofosfatias y los dos controles, (N) de la niñez y (A) de la adultez). (Imagen adaptada de Scriver 2001)

Se pueden medir los niveles de calcio, tanto en sangre como en orina, los cuales estarán aumentados en caso de hipofosfatias, debido a que hay poca captación de calcio por el esqueleto que crece poco y mal.

Los estudios bioquímicos de rutina muestran que las funciones renales y hepáticas no están alteradas. Además, se pueden dosar los fosfocompuestos, es decir los sustratos, en sangre u orina. Los niveles de fosfoetanolamina (PEA) en orina, ayudan al diagnóstico de la enfermedad, pero los niveles aumentados no son patognomónicos debido a que puede estar aumentado en otras patologías óseas. Se analiza los niveles de PEA en orina de 24 hs pero es necesario normalizarlo con la creatina. Sin embargo, los niveles de PEA están condicionados a la edad del paciente, al ritmo circadiano y sobre todo se han descrito algunos pacientes altamente afectados con niveles normales de PEA.

Los niveles de Piridoxal fosfato (PLP) en sangre resulta ser el sustrato más sensible para diagnosticar hipofosfatias (incluso para odontohipofosfatias). Sin embargo, administración de vitaminas hasta una semana antes de la prueba puede generar falsos positivos (Fig 21.7)

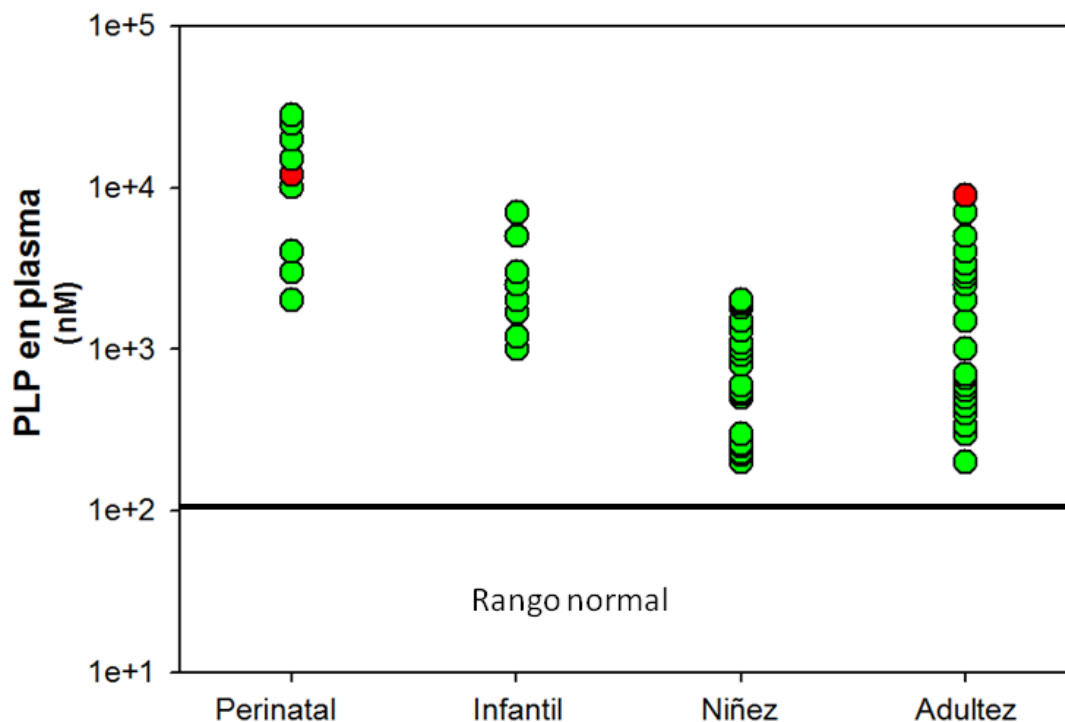


Figura 21.7. Niveles de PLP en sangre. En rojo se muestran dos niveles aumentados de PLP en sangre de pacientes bajo suplemento vitamínico. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

En cuanto al tercer y último sustrato, los niveles de pirofosfato inorgánico (PPI) en orina pueden dar elevado en la mayoría de los casos aunque pueden no mostrar aumentos en los casos leves; además, aun se encuentran en desarrollo técnicas confiables para poder medirlos.

En cuanto a los estudios radiográficos, se pueden utilizar como diagnóstico para los casos perinatal e infantil. Excepto para los casos de odontohipofosfatasa, siempre pueden encontrarse alguna manifestación en el esqueleto. Las radiografías dentales ayudan al diagnóstico de odontohipofosfatasa.

En cuanto al diagnóstico prenatal de parejas con casos previos de esta enfermedad, es necesario tener en cuenta varias situaciones. La actividad de FAL en fluido amniótico no es útil ya que a las semanas 14 a 16 de gestación, la mayor parte de FAL es de origen intestinal excretada por el feto. La medida de alfa-fetoproteína se utiliza para hacer el diagnóstico diferencial entre la forma perinatal y anencefalia, en este último caso, los niveles de esta proteína se encuentran elevados. La forma perinatal puede ser diagnosticada en útero a partir de la determinación de FAL en muestras de vellosidades coriales, utilizando anticuerpos o por RFLP durante el primer trimestre de embarazo y durante el segundo trimestre a partir de sonografía o radiografía fetal. Las formas moderadas o leves, no pueden ser diagnosticadas en el útero debido a que las primeras manifestaciones se dan luego de la etapa de la niñez.

No es recomendable realizar el consejo genético debido a varias razones:

- ✓ El tipo de herencia no es clara. Las formas severas suelen ser heredadas en forma autosómicas recesivas, mientras que las formas moderadas o leves pueden ser autosómicas recesivas o autosómicas dominantes.

- ✓ La expresión clínica de la hipofosfatasa es muy variable y existen muchos casos que se superponen en las tradicionales clasificaciones.
- ✓ Existe polimorfismo del gen de la FALTNE, casos en los que algunas mutaciones no se asocian con patologías.
- ✓ Algunos autores postulan que la expresión del gen FALTNE puede estar modulado por otros genes.

Todos estos factores hacen que sea difícil dar un consejo genético confiable a las parejas que ya han tenido hijos o embarazos con hipofosfatasa.

Tratamiento

Aunque se han estudiado posibles tratamientos, aun no hay una estrategia adecuada establecida para esta patología.

Los niveles de vitamina D deben ser bien regulados. Si existe un aumento en los niveles de vitamina D, aumentará la absorción intestinal de calcio provocando o agravando la hipercalcemia y la hipercalcemia. Sin embargo, un defecto en los niveles de la vitamina D o una disminución en la exposición a la luz solar, provocará un aumento en la reabsorción de calcio del esqueleto agravando la condición de los huesos.

El tratamiento de reemplazo enzimático se ha intentado a través del uso de infusiones intravenosas en individuos con distintos grados de afectación. Se probaron diferentes fuentes de FAL habiendo mejorías en algunos de los pacientes a los niveles de los fosfocompuestos, pero sin una mejora clínica reproducible y o mantenimiento en el tiempo de las afectaciones esqueléticas. Estos resultados apoyan la teoría que al menos para la mineralización del esqueleto y de los dientes, la FALTNE no es funcional en forma soluble y si cuando se encuentra en la superficie celular.

Algunos ensayos de trasplante de médula ósea con ratones KO para el gen de la FALTNE y en pacientes con hipofosfatasa infantil arrojaron resultados prometedores. Esto podría deberse a que durante el trasplante de médula ósea se está administrando al paciente células madre mesenquimales (Fig 21.8), las cuales son precursoras de los osteoblastos, aportando así una fuente adecuada de FAL necesaria para la mineralización del esqueleto.

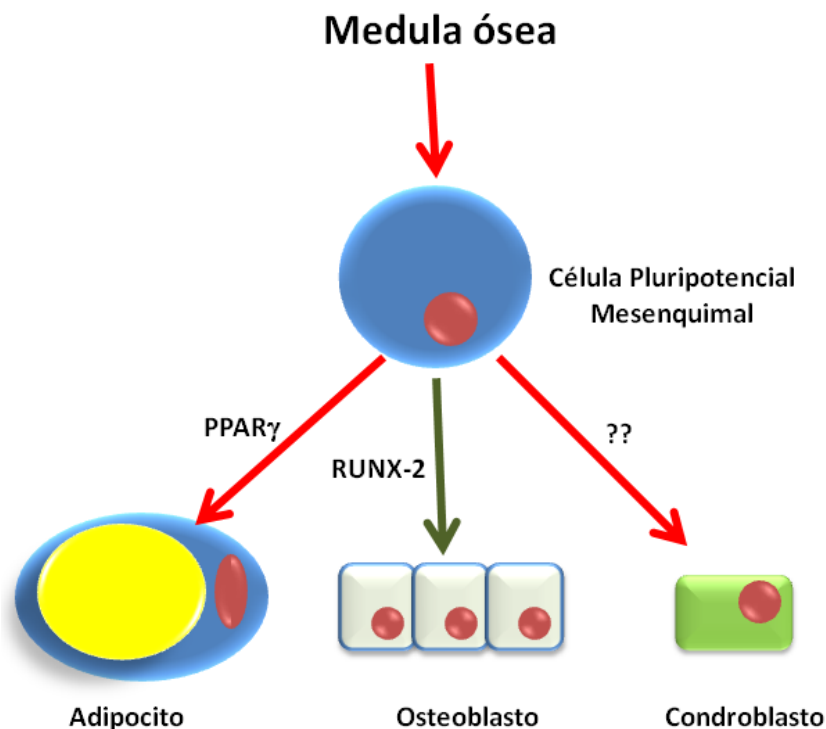


Figura 21.8. Las células pluripotenciales mesenquimales, provenientes del trasplante de medula ósea, puede diferenciarse en varios fenotipos entre los cuales se encuentra el osteoblasto, según el factor de transcripción que se exprese.

En cuanto al tratamiento de soporte, el mismo depende de las manifestaciones clínicas de cada paciente. Para aquellos que tengan aumento de la presión intracraneal esta se logra controlar con la instalación de una válvula. Las reparaciones de las fracturas óseas se deben monitorear con frecuencia a fin de poder verificar la correcta reparación. Se debe prestar atención a las pseudofracturas ya que las mismas pueden servir de punto de iniciación para futuras fracturas. En cuanto al estrés metatarsiano, se pueden utilizar plantillas u órtesis a fin de evitar las fracturas de los tarsos. Los problemas dentales deben ser atendidos por odontólogos con experiencia en odontohipofosfatasa.

Origen de los sustratos

Aunque el origen de fosfoetanolamina (PEA) es incierto, se cree que proviene de la degradación del sistema de anclaje fosfatidilinositolglicano, el cual sirve de anclaje de varias proteínas (entre ellas, la misma FAL) a la membrana plasmática de las células. El piridoxal fosfato (PLP) proviene de la dieta de la cual se puede encontrar una piridoxine, piridoxal, y piridoxamina. Una vez absorbidas estas formas de vitamina B₆, son convertidas en PLP en el hígado y enviadas a circulación para ser tomadas por las células que lo necesiten (Fig 21.9). Para que el PLP pueda entrar a la célula, este compuesto debe ser defosforilado por la enzima FALNE. Una vez dentro de la célula, el piridoxal es fosforilado nuevamente para formar PLP para ser utilizado como co-factor. Cuando ya no es requerido, la célula lo degrada a ácido 4 piridóxico (4-PA) y así puede ser eliminado vía renal.

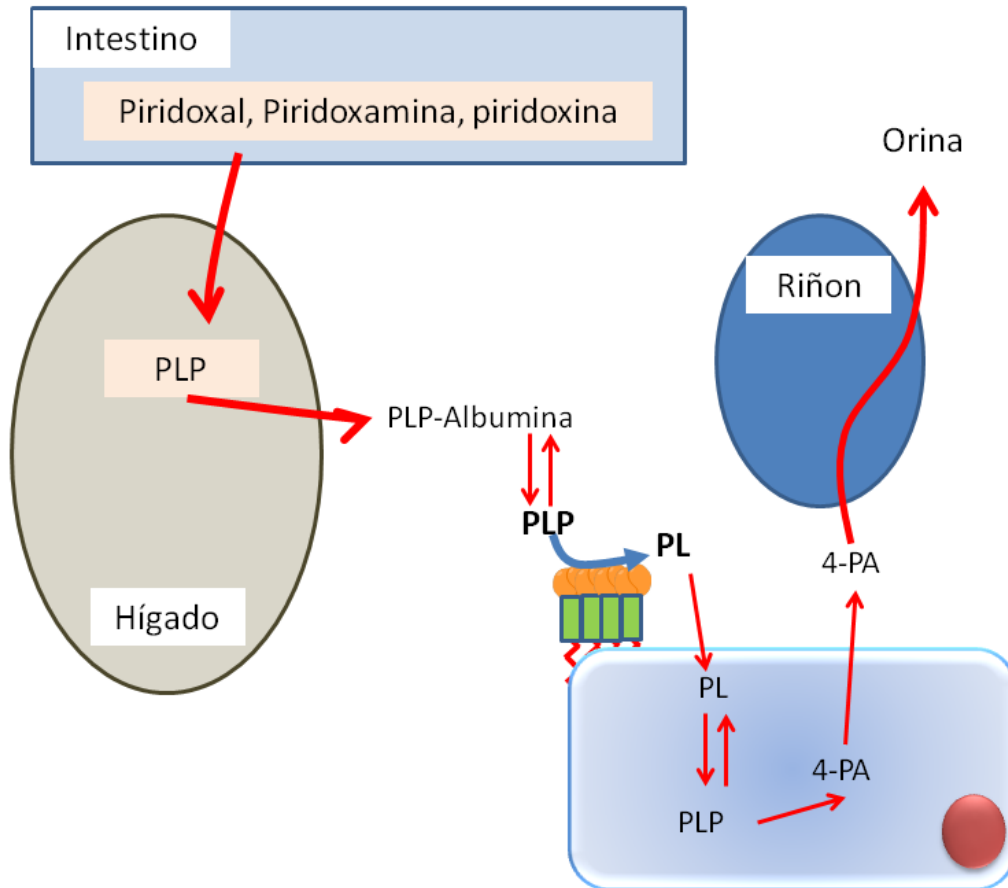


Figura 21.9. Absorción, metabolismo y eliminación del piridoxal fosfato (PLP). PL, piridoxal; 4-PA, ácido 4 piridóxico. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

Cuando los niveles de FALNE son elevados debido a otras patologías, los niveles sanguíneos de PLP disminuyen. Los niveles aumentados de PLP en hipofosfatasa demuestran la necesidad de la enzima en el metabolismo de PLP. Sin embargo, pacientes con hipofosfatasa no poseen síntomas de hipovitaminosis B₆ además de poseer niveles normales de PLP intracelular y de su metabolito en orina. Actualmente, hay dos hipótesis que pueden explicar este hecho.

- ✓ Si bien los pacientes con hipofosfatasa presentan una disminución en la actividad de la enzima, en todos los casos podría quedar cierta actividad remanente necesaria para desfosforilar el PLP y así permitir la entrar a las células, pero que esta actividad remanente no sería suficiente para permitir la mineralizar la matriz extracelular.
- ✓ Podría existir otra fosfatasa aun no identificada que pueda desfosforilar el PLP.

El Pirofosfato inorgánico (PPI) proviene de la degradación de los trifosfonucleotidos por medio de la enzima Nucleotido Triposfato Pirofosfatasa (NTP-PPI-asa). En la Fig. 21.10 se presenta el origen de los sustratos de FAL.

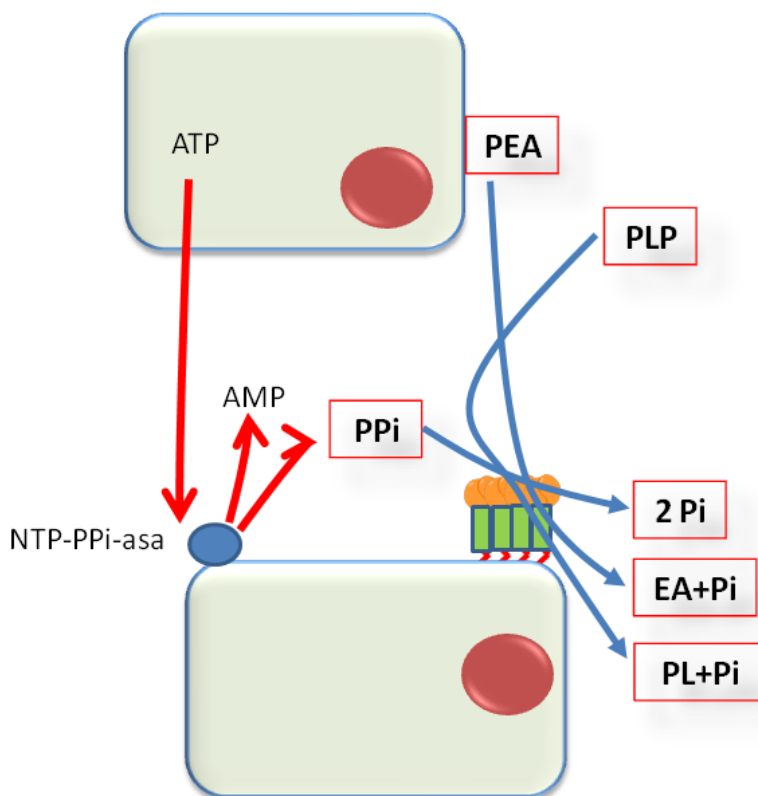


Figura 21.10. Origen de los sustratos de la enzima Fosfatasa Alcalina Tejido no específico. (Imagen adaptada de Scriver 2001)

A partir de la degradación de los sistemas de anclajes fosfatidilinositolglicano se libera fosfoetanolamina, de la degradación de los trifosfonucleótidos, por medio de la enzima Trifosfonucleotido Pirofosfatasa se produce pirofosfato inorgánico (Pi) y a partir del metabolismo de la vitamina B₆ se produce piridoxal fosfato. Estos tres fosfocompuestos son sustratos de la enzima FALTNE. Cuando hay deficiencia de esta enzima, estos sustratos se acumulan.

De los tres sustratos, se observó que solo el aumento de PPI tiene relación directa con los signos y síntomas de los pacientes con hipofosfatasa. A baja concentración de PPI, se forma cristales de pirofosfato de calcio dihidratado. Estos cristales producen daños en las articulaciones de los huesos pudiendo producir artropatía por pirofosfato, pseudogota y condrocalcinosis. A altas concentraciones, el PPI se absorbe al fosfato de calcio evitando la formación y maduración de los cristales de hidroxiapatita, constituyentes minerales de los huesos y dientes. De esta forma, la función de la enzima FALTNE de los osteoblastos sobre la mineralización de la matriz extracelular tiene una función dual. La primera es degradar todos los fosfocompuestos necesarios para que los fosfatos libres, junto al calcio produzcan sales de fosfato de calcio que madurarán hacia hidroxiapatita; la segunda función es hidrolizar el PPI, un inhibidor de la maduración de la hidroxiapatita. Así, cuando existe una deficiencia de la FALTNE, la falta de mineralización se debe tanto a que no hay fosfato necesarios para mineralizar la matriz, como a un entrono celular donde se acumula PPI.

Osteogénesis Imperfecta

La Osteogénesis Imperfecta (OI) es una enfermedad del tejido conectivo, hereditaria, clínica y genéticamente heterogénea, caracterizada por fragilidad ósea y susceptibilidad a las fracturas de bajo trauma. OI es una de las formas más comunes de enfermedades óseas por fragilidad hereditarias (1: 15-20.000 nacidos vivos). El 85-90% de los casos se deben a mutaciones en los genes del colágeno (*COL1A1* y *COL1A2*) que afectan su estructura o su cantidad y se manifiestan como formas dominantes, aunque actualmente se considera que la OI es un desorden relacionado con el metabolismo del colágeno. Se han descrito formas AR (10% de los casos de OI) que afectan genes que codifican para proteínas que interaccionan con el colágeno en su plegado o que intervienen en modificaciones pos-traduccionales. Otros defectos descritos afectan la mineralización y disminuyen la producción de colágeno y hay otros que afectan la diferenciación de los osteoblastos.

La clasificación de la OI evolucionó con los nuevos descubrimientos genéticos. En 1979, Sillence clasificó la OI en cuatro tipos, en base a las características clínicas y radiográficas de los pacientes:

Tipo I deficiencia cuantitativa del colágeno estructuralmente normal.

Forma más común de OI, pacientes en general con estatura normal y sin deformaciones óseas. Fragilidad ósea y escleróticas azules, la mitad de los casos con pérdida de audición. Pueden presentar Dentinogénesis imperfecta (DI).

Tipo II forma letal perinatal. Múltiples fracturas óseas al nacimiento. Esqueleto osteoporótico, huesos largos muy deformados, aplastamiento vertebral, escasa mineralización de la calota craneana y afectación de curvatura de las rodillas.

Tipo III forma severa. Deformante progresiva. Deformaciones óseas desde el nacimiento, escleróticas azules, DI, pérdida de audición y corta estatura. Múltiples fracturas, escoliosis progresiva, deformaciones torácicas

Tipo IV forma moderada. Deformante moderada y escleróticas normales. Deformaciones óseas, talla pequeña y pérdida de audición. Pueden o no presentar DI.

Las formas II-IV se deben a mutaciones que afectan la estructura normal del colágeno. Actualmente se ha propuesto una clasificación basada en la vía metabólica intra- y extracelular afectada. Se han descrito 18 tipos de OI, divididos en grupos funcionales, que dan cuenta de todos los casos descritos (Tabla 21.X)

Tabla 21.2. Nosología de la OI

Tipo de OI	Herenc.	Gen defect	Proteína
Defectos en síntesis y estructura Col Tipo I, II, III, IV	AD	<i>COL1A1</i> o <i>COL1A2</i>	Collageno 1(I) o 2(I)
Defectos en mineralización ósea Tipo V Tipo VI	AD AR	<i>IFITM5</i> <i>SERPINF1</i>	BRIL PEDF

Defectos en modificaciones del Col			
Tipo VII	AR	<i>CRTAP</i>	CRTAP
Tipo VIII	AR	<i>LEPRE1</i>	P3H1
Tipo IX	AR	<i>PPIB</i>	PPIB (CyPB)
Defectos en procesam./croslinkin			
Tipo X	AR	<i>SERPINH1</i>	HSP47
Tipo XI	AR	<i>FKBP10</i>	FKBP65
No clasificado	AR	<i>PLOD2</i>	LH2
Tipo XII	AR	<i>BMP1</i>	BMP1
Defectos en diferenciación - función Ob			
Tipo XIII	AR	<i>SP7</i>	SP7 osterix
Tipo XIV	AR	<i>TMEM38B</i>	TRIC-B
Tipo XV	AR / AD	<i>WNT1</i>	WNT1
Tipo XVI	AR	<i>CREB3L1</i>	OASIS
Tipo XVII	AR	<i>SPARC</i>	SPARC *
Tipo XVIII	XR	<i>MBTPS2</i>	S2P

AD, autosómica dominante; AR autosómica recesiva; XR recesiva ligada al X *, Osteonectina

Patofisiología en OI. Biogénesis de las fibrillas de colágeno

Las fibrillas de colágenos se depositan en la matriz extracelular del tejido conectivo, lo que le permite resistir a fuerzas tensiles. Se encuentran arregladas en una estructura tridimensional y son sintetizadas y secretadas por fibroblastos, osteoblastos etc. Se han identificado 27 tipos diferentes de colágenos, pero en el hueso el principal es el colágeno tipo I.

El colágeno fibrilar tipo I está compuesto por moléculas triméricas de dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una $\alpha 2(I)$. El dominio helicoidal de cada cadena consiste de tripletes repetidos Gly-X-Y, donde X e Y pueden ser cualquier residuo pero usualmente son Pro e hidroxipro respectivamente. La presencia de Gly, con su pequeño grupo lateral (-H) permite a la cadena de procolágeno monomérica formar una hélice de mano izquierda, que luego puede formar la triple hélice de mano derecha con otras dos cadenas. La triple hélice se encuentra flanqueada por dominios globulares terminales (N- y C-propeptidos) (Fig. 21.11). Una vez que estos extremos se clivan, la triple hélice con telopeptidos cortos se pueden ensamblar en estructuras altamente ordenadas como cuerdas, las fibrillas.

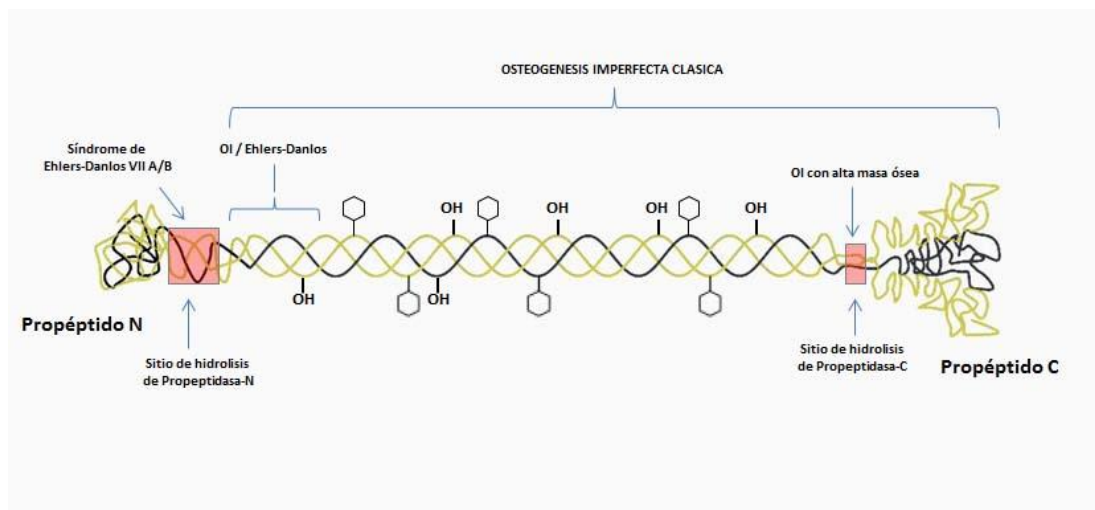


Figura 21.11. Estructura del colágeno tipo I y distintos fenotipos clínicos asociados con mutaciones en sitios específicos. Los hexágonos representan moléculas de azúcares unidas al residuo hidroxilo de Lys; OH-, representa el grupo hidroxilo unido a resto de Pro o Lys. Adaptado de Forlino & Mariani, 2016.

El ensamble de las cadenas desde el Ct continúa hacia el extremo del Nt. Las cadenas desarrolladas sufren varias modificaciones pos-traduccionales en el retículo endoplasmico (RER) y el Golgi (Fig. 21.12). Los restos de Pro y Lys son hidroxilados por acción de las enzimas *prolil-4-hidroxilasa* (P4H) y *lisil hidroxilasa 1* (LH1), los restos de hidroxil-Lys puede luego ser glicosilados. Por otro lado, la enzima *prolil-3-hidroxilasa* (P3H1) actúa como parte de un complejo asociada con la *proteína asociada a cartilago* (CRTAP) y *ciclofilina B* (CyPB), hidroxilando el carbono de la posición 3 de ciertos restos de Pro (986 en $\alpha 1(I)$ y 707 en $\alpha 2(I)$). La CyPB es una conocida peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa. Es necesaria la isomerización de las uniones prolil-peptidil para el correcto plegado del colágeno, lo que es catalizado por la enzima *prolil-cis-trans isómeras* (PPIasa).

Otra inmunofilina de RER es crucial para la síntesis normal del colágeno. La PPIasa FKBP65 que es codificada por el gen *FKBP10*. Se ha demostrado que FKBP65 se asocia con *lisil hidroxilasa 2* (LH2), enzima codificada en el gen *PLOD2*, que hidroxila restos de Lys en el telopéptido del colágeno. En el hueso, esta hidroxilación es necesaria para generar un cross-link entre las moléculas de colágeno, estabilizándolas y dando la fuerza tensil a las fibrillas. También en el RER se encuentra HSP47, una molécula chaperona codificada en el gen *SERPINH1*. HSP47 posee un sitio de reconocimiento RDEL (Arg-Asp-Glu-Leu), que permite el movimiento de la proteína entre el RER y el Golgi y su unión solamente a la triple hélice de colágeno. Funciona estabilizando el colágeno plegado y como un marcador para su transferencia al Golgi-*cis*. Así, el procolágeno plegado en la triple hélice es transportado a través de una vía secretoria desde el RER al Golgi, donde se transportan a través de las cisternas desde el Golgi-*cis* al *trans* y de allí a la membrana plasmática de la célula para ser secretadas al espacio extracelular.

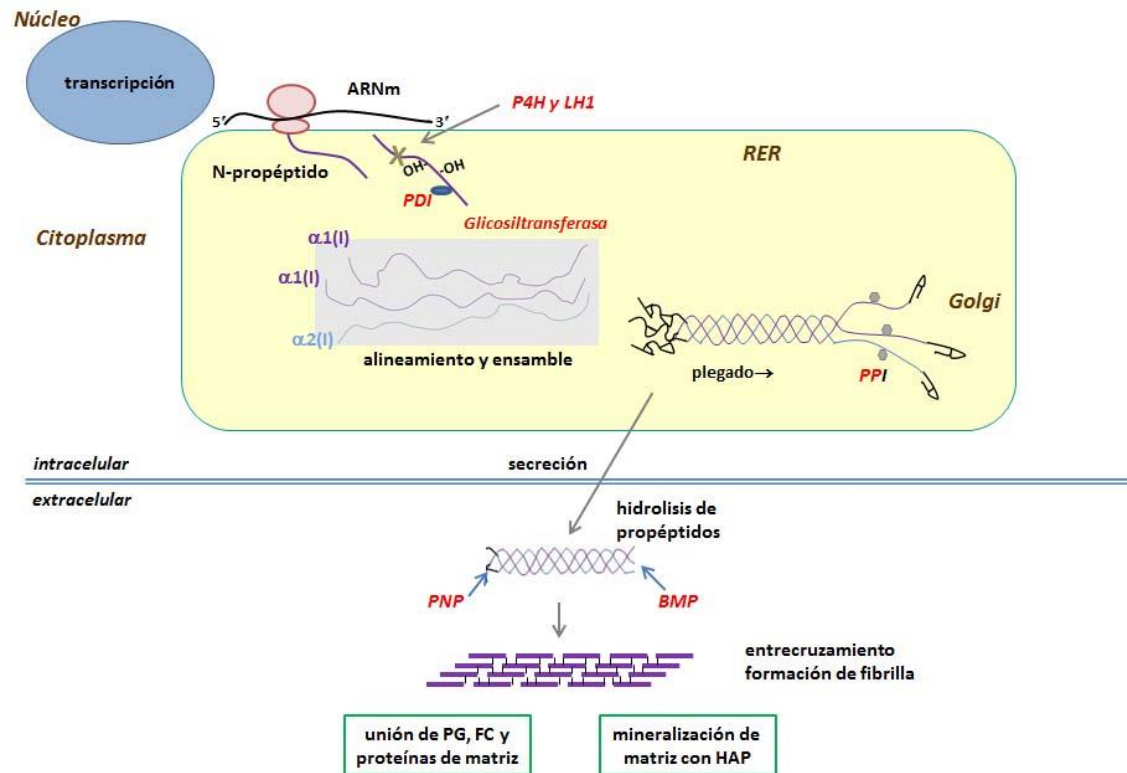


Figura 21.12. Biosíntesis de colágeno. Adaptado de Morello, 2018.

Después de la secreción, las moléculas sufren un proceso de maduración en el que los extremos N-propéptido y C-propéptido son removidos por proteasas específicas. Luego de esto, las hélices de colágeno se pueden ensamblar espontáneamente en fibrillas en el tejido, a través de procesos de *cross-link* (entrecruzamiento). El sitio de clivaje Nt se encuentra codificado en el exón 6 de ambas cadenas de colágeno, es removido por acción de la metaloenzima ADAMTS-2, que requiere una estructura helicoidal. El procesamiento del C-propéptido es más complejo, requiere 4 C-proteasas diferentes y la modulación de una proteína “*enhancer*” o potenciadora. El clivaje se realiza por la familia de metaloproteinasas de Zn (BMP-1, proteína morfogenética de hueso-1; mTLD, proteína toloide de mamíferos; TLL-1, proteína similar toloide-1) y una N-proteína de la familia ADAMTs.

La principal fuente de deposición de colágeno en el hueso son los osteoblastos, estas células proliferan, se diferencian y mineralizan la matriz colagenosa. Estos procesos son regulados a través de múltiples mecanismos y se conocen los genes y proteínas involucrados en los mismos. Varios de estos factores son importantes en el contexto de la OI.

Una de las vías cruciales en la regulación de la diferenciación osteoblástica es la Wnt. WNT es un ligando que se une a un sistema de receptores de membrana compuesto por Frizzled y dos correceptores, LRP5 y 6, proteínas relacionadas al receptor de LDL. A su vez, la señal de WNT regula la vía de β -catenina, que localizada en el núcleo activa genes “*blanco*” que estimulan la diferenciación; aunque que WNT también activa una vía independiente de β -catenina en el hueso. La proteína Sp7/Osx (Osx) es un factor de transcripción que contiene dedos de Zn, esen-

cial para la diferenciación osteoblástica. Otro gen que funciona mayormente a nivel de los osteoblastos es el *CREB3L1*, que codifica para una sustancia inducida específicamente por astrocitos viejos (OASIS, *old astocyte specifically induced substance*), un transductor del estrés del RE. Después de la proteólisis, el dominio Nt de OASIS se transloca al núcleo y activa el promotor del gen *COL1A1*. Un tercer gen con potencial mecanismo de acción sobre los osteoblastos es *SP7*, que codifica para osterix y es un gen “blanco” de la vía Wnt.

Otra proteína importante es PEDF (factor derivado de epitelio pigmentario, codificada en el gen *SERPINF1*, una glicoproteína secretada y conocida originalmente por sus propiedades neurotrópicas y antiangiogénicas. La expresan varias células, incluyendo condrocitos, en el plato de crecimiento, osteoblastos y células madre mesenquimales. En el hueso PEDF regula la homeostasis ósea y la mineralización del osteoide, afecta el desarrollo de los osteoblastos favoreciendo la expresión de genes osteogénicos y la deposición del mineral. Se cree que esta proteína funciona en conexión con IFITM5, (proteína transmembrana inducida por interferón, también conocida como BRIL (proteína similar IFITM restringida al hueso). BRIL tiene un dominio transmembrana simple, con un Ct extracelular; del lado citoplasmático BRIL está anclada a la membrana por dos restos de palmítico. BRIL se expresa exclusivamente en osteoblastos, no se detecta en condrocitos u osteocitos y muy poco en fibroblastos; puede regular la unión a Ca a través del Ct, lo que podría afectar la mineralización. Se ha postulado que BRIL podría regular la expresión de PEDF.

Defectos en el Colágeno: La causa más frecuente de OI es una mutación en un resto de Gly en la región helicoidal que puede afectar el ensamble de la hélice. Si ocurre en la cadena $\alpha 1(I)$, llevan a una forma letal de OI, mientras que en la cadena $\alpha 2(I)$, las sustituciones suelen ser no letales. Menos del 5% de las mutaciones que causan OI clásica ocurren en el propéptido-C, alterando la asociación o plegado de las cadenas. La presencia de una mutación nula en el gen *COL1A1* heterogénea lleva a una menor síntesis (aproximadamente 50%) en un colágeno normal y eso se asocia con una forma moderada de OI. Por otro lado, mutaciones nulas en el gen para la cadena $\alpha 2(I)$ producen síntomas variables, con cuadros de OI severa a una forma moderada de síndrome de Ehlers-Danlos.

Defectos en las modificaciones postraduccionales: mutaciones nulas para CRTAP causan OI tipo VII, mientras que en el gen *LEPRE1*, que codifica para P3H1, causa OI tipo VIII, ambas pueden ser severas a letales. Ambas mutaciones causan una importante reducción en la 3-hidroxilación de la Pro986, esto lleva a pérdida de arrollamiento del colágeno, sobre-modificación de las cadenas por hidroxilación y posterior glicosilación en restos de Lys. Por otro lado, mutaciones en *PIIB* causan formas raras de OI con fenotipos moderados a letales (tipo IX).

Deficiencia en *FKBP65* causa diversas afecciones, pero puede manifestarse en una forma recesiva de OI (tipo XI), progresiva deformante, con fracturas de huesos largos y escoliosis hasta una forma moderada, con estatura corta y ambulatoria, con escleróticas y dentición normales. Mutaciones en el gen *SERPINH1*, se describieron en un niño con OI recesiva severa (tipo X), con escleróticas azules, DI y características atípicas como bultos en la piel, estenosis pilórica,

cálculos renales. Su colágeno mostro aumento en la sensibilidad a proteasas, siguiendo a un plegado imperfecto.

Existen mutaciones que afectan los sitios de clivaje de los propéptidos y causan diferentes variantes de OI. Una causa de defectos en el procesamiento del Nt es el denominado “*skipping*” o salto del exon6 a nivel del ARNm, que elimina el sitio de clivaje, en alguna de las cadenas del Col(I). Este defecto se asocia con síndrome de Ehlers-Danlos, tipo VII, que presenta hiperextensibilidad tisular, hipermovilidad severa de articulaciones, dislocación de cadera bilateral congénita, escoliosis cauda por la hiperlaxitud de ligamentos y dislocación articular. También involucra OI, lo que resulta en fracturas en estos pacientes. Otra causa de defectos en el procesamiento del Nt implica mutaciones dominante en los primeros 85 residuos de la región helicoidal del colágeno $\alpha 1(I)$ o $\alpha 2(I)$, lo que despliega el sitio de clivaje del Nt, causando un síndrome combinado de Ehlers-Danlos y OI. Un tercer tipo de defecto en el procesamiento del Nt, es una mutación que afecta la actividad de ADAMTS-2, induciendo un defecto mucho más severo que los anteriores. Se asocia con defectos en el colágeno tipo I y tipo II, caracterizados por fragilidad extrema de la piel, facies características, laxitud articular, piel caída, hernia umbilical y escleróticas azules.

De la misma manera, se han descripto formas dominantes y recesivas asociadas a alteraciones en el procesamiento del Ct del colágeno. Estos defectos llevan a una forma de OI llamada de alta masa ósea. Pueden ocurrir mutaciones dominantes en los residuos Ala-Asp del sitio de clivaje en COL1A1 y COL1A2, lo que lleva a la incorporación de un pC colágeno (un procolágeno que no contiene el Nt pero si el Ct que no se pudo procesar) en la matriz extracelular. Los niños prepuberales con estas mutaciones presentan OI moderada con pocas características, estatura normal, escleróticas blancas, dientes normales y DMO que puede ser normal o aumentada. El tejido óseo de estos niños muestra un aumento en la mineralización. Se cree que la alta masa ósea sería causada por la localización del pC-procolágeno en la superficie de las fibrillas, que serviría como un factor de nucleación para la mineralización. Mutaciones en las enzimas involucradas (BMP1/mTLD), en el procesamiento del Ct resultan en una forma de OI más severa, dado que estas enzimas también procesan otros colágenos y activan *lisil oxidasa*, el iniciador del entrecruzamiento.

Defectos en la osificación y mineralización: se han descripto casos de OI asociadas con defectos en la osificación ósea endocondral o la mineralización. La forma tipo V de herencia AD y la forma tipo VI, AR. En el caso de la OI tipo V, se demostró la presencia de mutaciones en el gen *IFITM5*, caracterizada por aumentada osificación ectópica; y en el caso de la OI tipo VI, defectos en el gen *SERPINF1* que codifica para PEDF, asociada a normal o disminuida mineralización ósea y aumento en el volumen de osteoide no mineralizado. También se han reportado mutaciones homocigotas para SP7, asociadas con OI severa.

Defectos en el desarrollo osteoblástico: las mutaciones asociadas con estos defectos se expresan como formas de OI AR, son raras y se han descripto para SP7 (tipo XII), WNT1 (tipo XV) y CREB3L1 (tipo XVI).

Diagnostico

Inicialmente se basa en las características clínicas y radiológicas. La característica diagnóstica clave de la OI es la naturaleza generalizada de defectos en el tejidos conectivo.

- Fracturas de bajo trauma
- Hueso largos deformes (curvados)
- Dolor óseo
- Déficit de crecimiento
- Macrocefalia
- Facies triangular y plana
- Dentinogénesis imperfecta (falla en el desarrollo de la dentición)
- Deformaciones de la caja torácica (pecho en barril)
- Escoliosis o kifosis (curvatura convexa y excesiva de la columna)
- Radiografías: Osteopenia generalizada, huesos largo curvados, baja tabulación, costillas aplanadas, compresión vertebral
- Alteraciones no esqueléticas: escleróticas azules, pérdida de audición, disminuida función pulmonar, regurgitación en válvula cardiaca (solo en las formas AD)

Las formas de OI moderadas deben ser diferenciadas de casos de osteoporosis de expresión temprana en el adulto y de casos de abuso físico en niños. En estos casos, la densitometría ósea (DXA) ayuda en el diagnóstico diferencial. Pruebas (invasivas) basadas en **estudios histomorfométricos** muestran una disminución en el volumen óseo y bajo número de trabéculas, con alta velocidad de recambio óseo. Esta pruebas se han reemplazado por **estudios moleculares** para todos los tipos de OI y la determinación sérica del factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF) en el caso de la OI tipo VI. Para el caso de familias con un individuo afectado, se recomienda investigar las mutaciones en el gen del COL1, y en caso de dar negativo, se recomienda investigar otros genes de OI. El diagnóstico molecular es muy útil en el consejo sobre el pronóstico, recurrencia, la herencia y para la respuesta a diferentes tratamientos farmacológicos.

Los **datos de laboratorios** son normales en los casos de OI, aunque la ALP suele estar elevada después de una fractura. Los valores de las hormonas del eje de crecimiento también son normales.

Tratamiento

La mejor forma de tratamiento para estos pacientes es una intervención por un equipo multidisciplinario, a fin de que puedan mantener sus habilidades motoras, considerando que en esta enfermedad se combinan la fragilidad ósea, debilidad muscular y ciclos de fractura y desuso. Para esto se desarrollan programas de fisioterapia e hidroterapia. Por otro lado, las alteraciones de la función pulmonar son la causa más importante de morbilidad y mortalidad en OI. Esto se

asocia con escoliosis de más de 60°, deformación de la caja torácica que altera la función respiratoria, contribuyendo a infecciones e insuficiencia respiratoria. También debe controlarse la pérdida de audición, que comienza en la 1era o segunda década de vida.

Los **tratamientos farmacológicos** se basan primariamente en el uso de drogas antiresortivas, como los bisfosfonatos (BP), análogos sintéticos del pirofosfato. Los BP se unen a la matriz de hidroxapatita en formación y son tomados por precursores osteoclasticos u osteoclastos maduros, induciendo su muerte por apoptosis. Así, se contrabalancea el alto recambio óseo incrementando la formación ósea a través de la acción de los osteoblastos. Aunque los pacientes tendrán un colágeno alterado (en la mayoría de los casos), se cree que el tratamiento con BP que aumenta el volumen de hueso sería beneficioso para la fortaleza ósea. Varios trabajos han demostrado que estos tratamientos son efectivos, más aun en las formas leves a moderadas de OI.

Actualmente se están investigando el uso de drogas con acción anabólica sobre la formación del hueso. Estas son anticuerpos anti *esclerotina*, un regulador negativo de la formación del hueso que actúa a través de la vía Wnt y otro es un anticuerpo contra TGF β (factor de crecimiento transformante).

Referencias

- Ciancaglini P, et. al. Kinetic Analysis of Substrate Utilization by Native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-Deficient Matrix Vesicles. *Journal of Bone and Mineral Research* 2010 (25) 716.
- Mornet E. Hypophosphatasia. *Orphanet Journal of Rare* 2007 (2) 40.
- Forlino A, Marini JC. Osteogenesis imperfect. *Lancet* 2016; 387, 1657-1671.
- Morello R. Osteogenesis Imperfecta and Therapeutics. *Matrix Biol* 2018; 71-72, 294-312.
- Mornet E. Hypophosphatasia. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2008 (22) 113.
- Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 9th Edition. John P Bilezikian (Ed in chief). Wiley Blackwell-2019 American Society for Bone and Mineral Research.
- Scriver, C. R; Beaudet, A. L; Sly, W. S; Valle, D.; Childs, B.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. *The Metabolic and Molecular base of inherited disease*. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 8th edition (2001).
- Simon-Bouy B, et. al. Hypophosphatasia: molecular testing of 19 prenatal cases and discussion about genetic counseling. *Prenat Diagn* 2008 (28) 993.
- Stevenson D, et. al. Autosomal Recessive Hypophosphatasia Manifesting in Utero with Long Bone Deformity but Showing Spontaneous Postnatal Improvement. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 (93) 3443.
- Van Hoof, VO; de Broe, ME. Interpretation and clinical significance of alkalines phosphatase isoenzyme patterns. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science* 31, 1994; 19-293.

Whyte M. Hypophosphatasia. *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease* 2013, capítulo 22 337-360.

Whyte M. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2010 (1192) 190.

Zhou X, et. al. Phosphate/Pyrophosphate and MV-related Proteins in Mineralisation: Discoveries from Mouse Models. *International Journal of Biological Sciences* 2012 (8) 778.

CAPÍTULO 22

Enfermedades Neurodegenerativas.

Alzheimer - Parkinson

Juan Manuel Fernández

Generalidades

Antes de comenzar con la descripción del Síndrome de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, debemos mencionar algunas generalidades comunes a las enfermedades neurodegenerativas. Estas son un grupo de enfermedades que afectan al sistema nervioso central, siendo dos características importantes la naturaleza degenerativa y el curso crónico de las mismas. Es decir, para que comiencen a manifestarse los síntomas deben antes perderse un porcentaje de neuronas de ciertos grupos neuronales, lo cual no ocurre en forma instantánea, sino que se desarrolla progresivamente a lo largo de la vida. Las patologías más frecuentes son el Síndrome de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson. Sus causas no se conocen con certeza, pudiendo ser multifactorial, es decir en la patogénesis de estas enfermedades participan factores genéticos/epigenéticos, stress oxidativo, apoptosis, traumatismo encefálico antiguo, exposición a tóxicos, infecciones, alcohol, etc. Sin embargo, hoy en día, se han hecho avances en el descubriendo de genes y los mecanismos que llevan al desarrollar estas patologías. Actualmente no hay un tratamiento efectivo para la cura de estas enfermedades y esto se debe a que no existen terapias que prevengan la muerte neuronal o efectivamente induzcan la regeneración de las neuronas, por lo tanto los tratamientos se encuentran abocados a mejorar el bienestar de los pacientes.

Debido a que se necesita tiempo para que se produzca la muerte de un gran número de neuronas, estas enfermedades afectan mayoritariamente a personas en la tercera edad, aunque no en forma exclusiva ya que alrededor del 10 % de los pacientes presentan una forma de expresión temprana. Estos últimos casos se asocian no a factores ambientales, sino a mutaciones en genes "candidatos". Gracias a la aparición temprana (o también llamadas formas familiares) se han descubierto genes involucrados en la patogénesis de estas enfermedades que aportan nuevos conocimientos sobre los posibles mecanismos que desencadenan este tipo de enfermedades neurodegenerativas. Además, originalmente se creía que Alzheimer y Parkinson eran males interrelacionados, hoy en día, gracias los estudios genéticos, se sabe que son dos enfermedades independientes. No obstante se sabe que existen algunos factores de riesgo comunes, lo que indicaría que estas enfermedades podrían compartir algún mecanismo común en el desarrollo de la muerte neuronal.

Enfermedad de Alzheimer

En el año 1906, el psiquiatra Alois Alzheimer, diagnosticó a una mujer de 56 años con demencia progresiva que muere por una enfermedad grave del cerebro. Haciendo cortes histológicos del cerebro post mortem, se encuentran acúmulos extracelulares (llamadas placas seniles) e intracelulares (llamado ovillos neurofibrilares), además de una disminución del tamaño del cerebro. Esta enfermedad se la puede definir como una afección cerebral adquirida que produce una alteración en las funciones intelectuales y/o de conducta del sujeto. Estas alteraciones suelen llegar a ser tan importantes que puede interferir con las conductas y memorias de los pacientes llegando al punto de lograr una total dependencia. . Actualmente, es el tipo de demencia más común, siendo progresiva e invalidante, es decir, que los síntomas comienzan a aparecer paulatinamente, en distinta combinación de ellos y en forma leve. Para su desarrollo se debe perder un gran número de neuronas (alrededor del 80 %), luego, a medida que transcurre el tiempo, la gravedad de los síntomas irá en aumento. Durante el proceso de neurodegeneración, se ven afectados varios núcleos del cerebro tales como el hipocampo, la corteza y la amígdala, causando deterioro en las habilidades cognitivas.

Existen dos fenotipos de esta enfermedad, la forma esporádica, la cual explica el 90-95% de los casos y se debe a factores de tipo ambientales (edad avanzada, bajo IQ, bajo nivel educacional, traumatismo encefálico, enfermedad cardiovascular, etc) y principalmente de aparición tardía, expresándose en promedio a los 65 años de edad. El otro fenotipo es el familiar, explica el 5 al 10% de los casos y se debe a mutaciones en diversos genes (presenilina 1, presenilina 2 o proteína precursora amiloide) y la edad de aparición es más temprana (entre 35 y 65 años de edad).

La prevalencia de la enfermedad depende de los rangos etarios. A los 65 años, ronda entre 5 al 10%, mientras que se presenta en el 30% de las personas mayores de 80 años. Según el informe del 2015 emitido por Alzheimer´s Disease International, en el mundo existen 46.8 millones de personas con esta enfermedad, lo que ha llevado a un gasto de U\$S 818 mil millones entre costos médicos directos, costos sociales directos y costos de asistencia informal. Por otro lado, debido a un aumento en la expectativa de vida en el mundo, se estiman que para el año 2050, el número de casos aumentará a 132,5 millones a nivel mundial, cuadruplicándose los costos.

Características Clínica

Respecto a las manifestaciones clínica, se produce un deterioro progresivo con pérdida de las funciones cognitivas. Las principales manifestaciones son:

- ✓ Amnesia: la cual es una pérdida selectiva de la memoria que impide aprender cosas nuevas o recordar lo aprendido previamente.

- ✓ Afasia: pérdida del lenguaje. Las personas comienzan olvidando palabras, nombres, pierden la capacidad de armar frases cortas y de comunicarse, hasta llegar al mutismo.
- ✓ Apraxia: consiste en la pérdida de la capacidad para realizar tareas complejas que involucren coordinación muscular. De a poco, los pacientes empiezan a perder la capacidad para realizar tareas de rutina como cocinar, bañarse, cambiarse, conducir, etc.
- ✓ Pérdida de las funciones ejecutivas, con pérdida de la capacidad de razonamiento, de planificación etc.
- ✓ Alteraciones conductuales: se producen cambios en la personalidad, pueden presentar apatía, paranoia, depresión, agitación, alucinaciones, delirios, irritabilidad, desinhibición, agresión verbal, agresión física, trastornos del sueño.
- ✓ Anosognosia: lo que resulta en auto-desconocimiento de su condición, ya sea total o parcial. El estado de la anosognosia, se relaciona en forma directa con el estadio de la enfermedad.

Es posible clasificar la progresión, aunque no siempre, en tres etapas. La etapa temprana dura entre 2 a 5 años, en el que se produce un deterioro paulatino de la memoria reciente. La etapa intermedia, que dura entre 2 a 10 años, se caracteriza por con alteraciones de las funciones cerebrales y en la etapa tardía, los síntomas cerebrales se agravan, produciéndose pérdida de la personalidad, paranoia, depresión, mutismo, etc. A medida que transcurre el tiempo, este deterioro de las funciones cerebrales se acompaña de un deterioro en la salud, siendo las causas más probables de muerte la neumonía y la insuficiencia urinaria, acompañado por infecciones generalizadas y problemas cardíacos. Además, el sistema inmune se deteriora debido a la mala nutrición y la pérdida de peso, haciendo más frecuentes y graves las infecciones.

Como se mencionó anteriormente, aproximadamente el 10% de los casos son de aparición temprana o también llamados de etiología familiar. Esto se debe a que mutaciones de ciertos genes (los cuales se heredan en forma autosómica dominante) que desencadenan la patología a temprana edad. El estudio de estos genes ha podido contribuir a esclarecer (aunque aun parcialmente) las vías y mecanismos implicados que conllevan a la enfermedad. Los genes involucrados hasta ahora son: APP (proteína precursora de péptido amiloide), PS1 (presenilina 1) y PS2 (presenilina 2).

Proteína precursora péptido amiloide

Esta proteína se encuentra ubicada en la membrana plasmática y su gen esta codificado en el cromosoma 21. Las personas que padecen trisomía del cromosoma 21 (Síndrome de Down), produce un aumento de la expresión de esta proteína aumentando la probabilidad de desarrollar Enfermedad de Alzheimer a edad temprana. Esta proteína sufre una serie de escisiones proteolíticas las cuales generan fragmentos más cortos (Fig 22.1) que luego podrán ser eliminados.

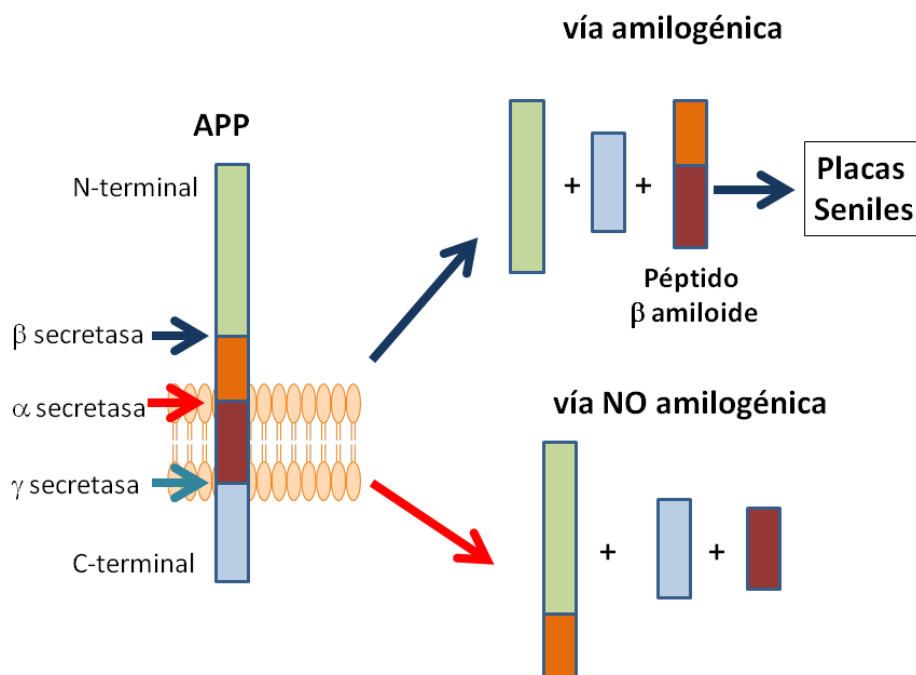


Figura 22.1. La proteína precursora amiloide puede clivaje mediante dos vías. En la vía no amiloide, las α y γ secretasas producen la hidrólisis del APP, mientras que en la vía amiloide, se genera el péptido β amiloide debido a la hidrólisis a través de β y γ secretasas

Como se puede ver en la figura 22.1, existen dos vías de procesamiento proteolítico de la APP. En la vía no amilogénica, APP es hidrolizado por α y γ secretasas, dando lugar a la aparición de 3 fragmentos. Por otro lado, durante la vía amilogénica, actúa la β secretasa sobre el péptido precursor y a continuación una γ secretasa, para generar un péptido de 42 aminoácidos llamado péptido β Amiloide. Este fragmento, un poco más largo que el péptido que resulta de la hidrólisis de α y γ secretasas, es un péptido de difícil eliminación. Se postula que su acumulación extracelular en el cerebro induciría efectos tóxicos asociados con la muerte neuronal.

Proteína Tau

La enfermedad de Alzheimer, está caracterizada también por lesiones neuronales asociadas con la presencia de ovillos neurofibrilares, los cuales se encuentran conformados por una proteína llamada Tau. Esta proteína se encuentra mayormente en las neuronas y pertenecen a la familia de proteínas asociadas a los microtúbulos. Su gen está codificado en el cromosoma 17, puntualmente en el brazo largo y su principal función es ayudar a la polimerización y dar estabilidad en los microtúbulos de las neuronas. La proteína Tau puede ser fosforilada y de esta forma es finamente regulada desde el nacimiento hasta la edad adulta. Sin embargo, cuando la proteína Tau se hiperfosforila, pierde su afinidad por los microtúbulos de las neuronas. La proteína Tau puede ser fosforilada y de esta forma es finamente regulada desde el nacimiento hasta la edad

adulto. Sin embargo, cuando la proteína Tau se hiperfosforila, pierde su afinidad por los microtubulos. En condiciones patológicas, se han encontrado niveles elevados de proteína Tau hiperfosforiladas en el citosol formando filamentos de distintas conformaciones espaciales, las cuales se las llamo ovillos neurofibrilares. La perdida de la función normal de esta proteína, conduce a una alteración patológica en las funciones estructurales y en la regulación del citoesqueleto, afectando tanto la funciones normales de la neurona como el mantenimiento de una morfología apropiada y el transporte axonal, lo cual lleva a la disfunción sináptica y la neurodegeneración.

Aun no quedan claro el mecanismo por el cual se desencadena la hiperfosforilación de la proteína Tau, sin embargo, se ha postulado la hipótesis de la Cascada Amiloide como un posible mecanismo.

Cascada Amiloide

Básicamente, la cascada amiloide postula que la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer se debe a la acumulación de las placas amiloides en varias regiones del cerebro, las cuales actúan como un desencadenante patológico que conducen a la hiperfosforilación de la proteína Tau para luego formar los ovillos neurofibrilares y así producir la muerte neuronal. Esta hipótesis se fortalece por evidencia genética, bioquímica y patológica que demuestra que las formaciones de las placas son la causa principal en la enfermedad de Alzheimer. Las placas amiloides están formadas principalmente por el péptido β amiloide. En la figura 22.2 se puede ver un resumen de los pasos involucrados en la hipótesis de la cascada amiloide.

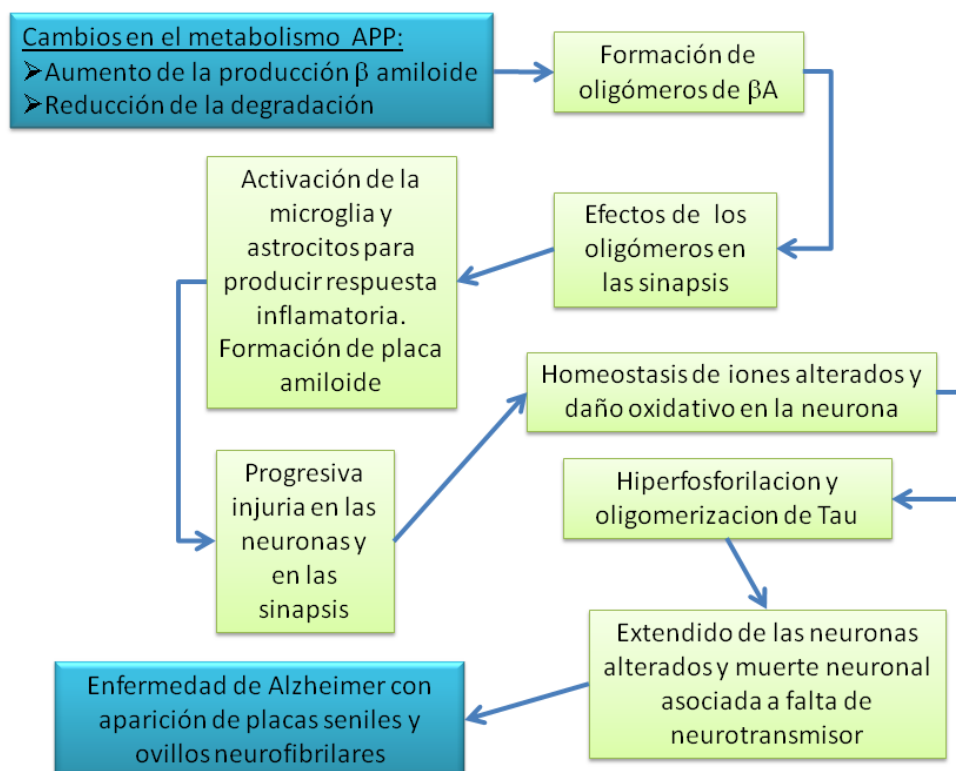


Figura 22.2. Hipótesis de la Cascada Amiloide mostrando los posibles pasos que conectan el péptido β amiloide con la hiperfosforilación de Tau. (Imagen adaptada de Barage 2015)

La formación de las placas amiloide se debe a la hidrólisis incorrecta del péptido β Amiloide. Este péptido posee una velocidad de degradación reducida, dando lugar a la oligomerización del mismo, activando una respuesta inflamatoria por parte de la activación de las células de la microglia y los astrocitos y creando así la placa amiloide. Esto lleva a una progresiva injuria sobre las neuronas, alterando la homeostasis iónica y provocando daño oxidativo. Este proceso desencadena la hiperfosforilación de la proteína Tau formando oligómeros de ella que afectan la formación de la neurona y conllevan a la muerte neuronal por deficiencia de neurotransmisores.

Presenilina 1 y 2

Las presenilinas 1 y 2 son proteínas que se encuentran predominantemente en las neuronas y que están codificadas por los genes PSEN 1 y PSEN 2, situados en los cromosomas 14 y 1 respectivamente. Si bien sus funciones aún no se conocen con exactitud, se cree que se encuentran involucradas en el tráfico de proteínas y en rutas de señalización del tipo Notch. Mutaciones de estos genes se asocian con enfermedad de Alzheimer, con una herencia autosómica dominante. Los mecanismos por los que esto ocurre no se conocen, pero mutaciones en los genes PSEN 1 y PSEN 2 alteran el metabolismo de APP elevando los niveles del péptido β Amiloide.

Apolipoproteína E

Otra proteína involucrada es la apolipoproteína E, que se encuentra codificada en el cromosoma 19 y posee tres alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. Varios estudios sugieren que el alelo $\epsilon 4$ del ApoE4 puede incrementar la agregación del péptido β amiloide y perjudicar su aclaramiento. De esta forma, se ha demostrado que este alelo de ApoE4 es uno de los principales factores de riesgo de esta enfermedad.

En la figura 22.3, se puede observar los factores genéticos involucrados en la enfermedad de Alzheimer de etiología familiar.

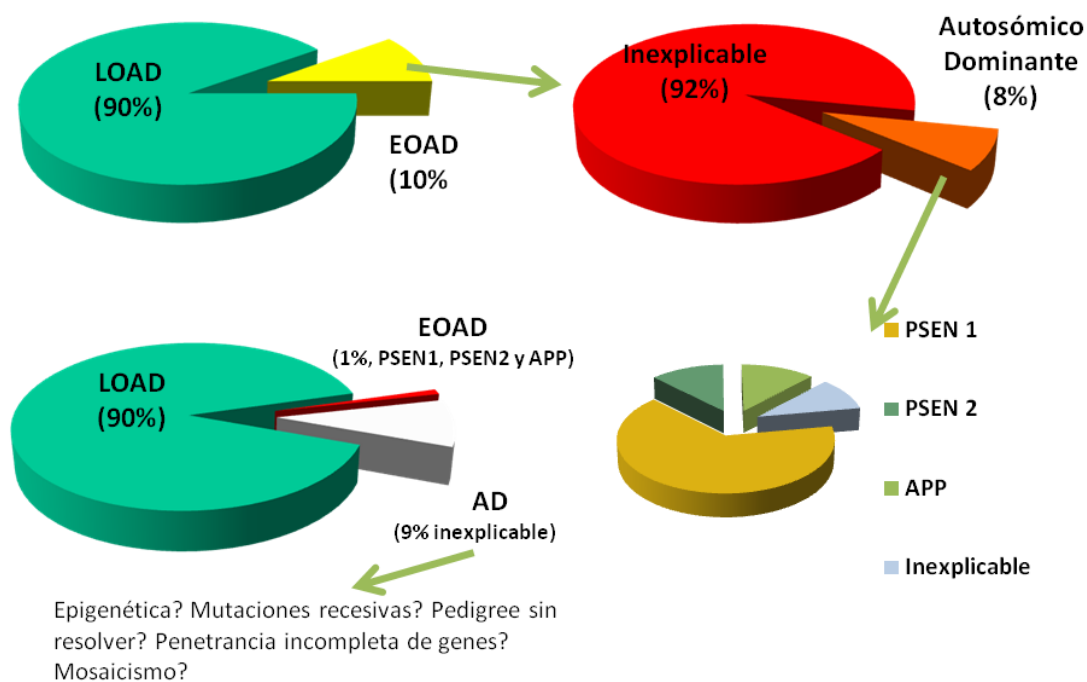


Figura 22.3. Factores genéticos de la enfermedad de Alzheimer.

Se pueden notar como los hasta ahora únicos genes asociados a los casos de aparición temprana (EOAD, de su sigla en inglés *early onset Alzheimer Disease*) solo explican el 8% de casos reportados de Alzheimer de etiología familiar, demostrando que tal vez, otro gen o genes esté(n) implicado(s) en los casos de aparición temprana de esta enfermedad. Es probable, que con el descubrimiento de nuevos genes asociados a esta patología colabore en dar explicación y tratamiento para los casos esporádicos (LOAD, de sus siglas en inglés *late onset Alzheimer Disease*).

Diagnóstico

No existe un test de laboratorio que pueda utilizarse para diagnosticar la Enfermedad de Alzheimer. Se deben descartar la presencia de otras situaciones que pueden llevar a algunos de los síntomas característicos de esta enfermedad, tales como microembolias debido a Diabetes Mellitus, hipertensión arterial, enfermedad cardíaca, etc. Se deben realizar varias evaluaciones como pruebas neurológicas, psiquiátricas, medicación, examen físico. Además, se debe investigar la forma en que comenzaron los síntomas, en este punto es de gran importancia, debido a la anosognosia, la información que puedan proveer los familiares de los pacientes, sobre todo el cuidador a cargo. Se pueden realizar neuroimágenes del tipo estructural (como ser TAC o RMN) en donde se observará entre otras cosas, un cerebro de menor volumen con un espacio ventricular agrandado. Se pueden realizar estudios de imágenes del tipo funcional, como SPECT (tomografía computada de emisión de foton simple) o cámara gamma del cerebro, esta última permiten evaluar las áreas de cerebro activas midiendo el consumo de glucosa marcado radiactivamente. Hasta el momento, el único método para diagnosticar la Enfermedad de Alzheimer es mediante una necropsia a fin de observar las placas seniles y los ovillos neurofibrilares.

Tratamiento

No existe un tratamiento que de cura a la enfermedad. Los mismos, en la actualidad tienen como objetivo mejorar la calidad de vida del paciente y retrasar el curso de la enfermedad. Sin embargo, se están estudiando distintos tratamientos que tienen como objetivo la regeneración neuronal (por ejemplo, trasplante de células madres, células madres con vectores virales que permitan la diferenciación neuronal, etc), desarrollo de vacunas que sirvan para entrenar el sistema inmune y que sea este el encargado de eliminar las placas seniles. Otra estrategia esta destinada a detener el clivaje de APP a partir de la inhibición de la β secretasa, la γ secretasa o aumentar la actividad de la α secretasa, además de favorecer la eliminación del péptido β amiloide.

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson fue descrita en 1817 por el médico James Parkinson quien describió 6 pacientes con síntomas, cuya enfermedad lleva su nombre. Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente pero es la primera asociada con alteraciones del movimiento y ocurre debido a la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas. Su frecuencia es del 1% en mayores de 65 años, llegando a ser de hasta el 5% en individuos mayores de 85 años. Al igual que la enfermedad de Alzheimer, puede ser causada por factores ambientales, genéticos o ambos, en donde alrededor del 90% de los casos es de forma esporádica, es decir causada por factores ambientales cuya edad de aparición es la 3ª edad.

Al igual que la Enfermedad de Alzheimer, en esta enfermedad debe ocurrir una muerte neuronal del 70% para que se inicien las manifestaciones clínicas mientras que normalmente una persona de 65-70 años, poseen una muerte neuronal de alrededor del 4%. Esta diferencia de porcentajes nos demuestra el curso crónico de la patología y lo silenciosa que es la neurodegeneración.

En este caso, la muerte neuronal ocurre en una región del cerebro llamada sustancia negra, la cual se encuentra situada en el mesencéfalo, cuyo neurotransmisor es la dopamina. Este núcleo envía sus proyecciones neuronales a los ganglios basales conformados por los núcleos putámen, caudado y globo pálido. Estos tres núcleos se encuentran asociados a los movimientos voluntarios que se realizan de forma inconsciente (como por ejemplo, tomar un picaporte para abrir una puerta). La sustancia negra, a través del neurotransmisor dopamina funciona como un sistema de recompensa hacia estos núcleos. Al realizar un corte histológico en esta sección en pacientes con la Enfermedad de Parkinson, se puede observar una gran disminución del número de neuronas así como inclusiones citoplasmáticas eosinófilas llamadas cuerpos de Lewy.

La clínica de la enfermedad es progresiva a tal punto que la sintomatología inicial se la considera inespecífica. Los pacientes acusan inicialmente fatiga, dolores que podrían confundirse con problemas reumatológicos, siendo la evolución de los síntomas lenta pero progresiva. Los principales síntomas de la Enfermedad de Parkinson se los conoce como tríada clásica y son los siguientes:

- ✓ **Temblores:** consiste en una contracción alterna de los grupos musculares opuestos causando un movimiento de baja amplitud y de unos 4 a 7 Hz. Estos pueden ser asimétricos y unilaterales. Como característica, estos temblores disminuyen cuando hay movimiento voluntario, mientras que aumenta cuando el paciente se encuentra agotado. Estos temblores suelen comenzar en las manos e ir progresando con el tiempo al brazo siendo poco frecuente en las piernas.
- ✓ **Bradiquinesia:** resulta en la lentitud de los movimientos voluntarios, a tal punto que puede llegar a aquinesia.
- ✓ **Rigidez:** consiste en la resistencia al movimiento pasivo de una articulación por un aumento en el tono muscular. Existen dos tipos de rigidez muscular, llamadas tubo de plomo o constante y rueda dentada o variable. Esto se debe a las diferencias entre ellas. En la primera, por ejemplo, ante el ejercicio de querer doblar el codo, el médico se encuentra con una rigidez tal que no permite doblarlo (como si fuese todo el brazo y antebrazo un solo tubo de plomo), mientras que en el caso de la rueda dentada, ante el mismo ejercicio, el médico logra doblar el codo del paciente pero barriendo de a pocos ángulos a la vez en lugar de que sea todo un movimiento continuo (como el funcionamiento de las ruedas dentadas o engranajes de un reloj).

Otros síntomas que se manifiestan a medida que avanza la enfermedad son:

- ✓ Deterioro de la marcha: Los pacientes suelen adquirir inestabilidad postural, se dificulta el inicio de la marcha además de dar pasos cortos mientras arrastran los pies (festinación).
- ✓ Hipomimia, también llamada cara de poker. Sobre el rostro se ven una mímica anulada sin tener capacidad de demostrar gestos o expresiones.
- ✓ Funciones vegetativas: se pueden encontrar problemas de aumento en la sudoración, sialorrea (niveles excesivos de salivación), constipación y disfunción intestinal, hiposmia (capacidad disminuida del sentido del olfato), impotencia, pérdida de la libido.
- ✓ Demencia, psicosis, depresión. Muchas veces, los tratamientos apuntan a disminuir la depresión para motivarlos a realizar los ejercicios kinesiológicos que ayudan a disminuir los avances de los síntomas.

De los casos de aparición temprana, se ha podido estudiar distintos genes que, al estar afectados desencadenan la enfermedad de Parkinson

En la tabla 21.1 se pueden observar los genes más relevantes (pero no únicos) involucrados en esta enfermedad.

Tabla 21.1

Gen	Herencia	Ubicación	Cuerpo de Lewy
α Sinucleína	AD	4q	Si
Parkin	AR	6q	No
UCH-L1	AD	4p	Si

De los genes involucrados, descubiertos hasta ahora, la α sinucleína (α sin) parece tener un rol central en esta patología siendo el principal constituyente de los cuerpos de Lewy.

α Sinucleína

El gen de esta proteína puede tener diversos tipos de mutaciones, como ser mutaciones puntuales, deleciones, o multiplicación del gen (duplicación, triplicación e incluso hasta cuadruplicación). Es una proteína que no posee estructura terciaria y se encuentra ubicada en la membrana citoplasmática. Si bien, su función aun no es clara, se cree que se encuentra implicada en el tránsito de vesículas de neurotransmisores. Además, esta proteína es susceptible a sufrir modificaciones y cuando esto ocurre, la α sin modificada se libera de la membrana citoplasmática, acumulándose en el citoplasma de la célula, formando oligómeros los cuales formaran polímeros que darán origen a la formación de filamentos. Estos a medida que crecen, unen distintos componentes intracelulares formando así los cuerpos de Lewy. Sin embargo, el mecanismo por el cual se modifica y se acumula la α sin depende de las mutaciones del gen o de factores ambientales. Una de las formas de poder degradar proteínas es mediante los lisosomas, cuando una proteína está dañada, esta es reconocida por una chaperona la cual la transporta hasta el lisosoma para que pueda ser degradada. La proteína entra al lisosoma gracias a una translocasa lisosomal. Algunas mutaciones de α sin poseen alta afinidad por la translocasa, de esta forma queda unida fuertemente a ella sin entrar al lisosoma y sin degradarse, así, aumenta la concentración de α sin en el citoplasma haciéndola más susceptible a modificaciones. Otro tipo de mutación es el aumento de copia del gen, cuando esto ocurre, se produce un aumento en la concentración de la proteína α sin en el citoplasma con un aumento en sus modificaciones.

No solo se producen modificaciones de la α sin por mutaciones de su gen. Existen mutaciones de otros genes característicos de otros tipos de patologías que pueden conducir a modificaciones de la α sin. Por ejemplo, en la enfermedad de Gaucher, portadores heterocigotos de la mutación de la enzima glucocerebrosidasa, hace que en la membrana sináptica exista un exceso de fosfolípidos, llevando a que la α sin tenga una menor afinidad por la membrana, liberándose al citosol donde es propensa a modificaciones.

Parkin

La proteína parkin se encuentra asociada al sistema de degradación a través de la vía de proteosomas. Mutaciones en este gen, desencadenan la enfermedad de Parkinson a temprana edad, pero con ausencia de cuerpos de Lewy. Parkin, pertenece a una clase de Ubiquitin E3 Ligasa, la cual es necesaria para que ciertas proteínas puedan ser degradadas mediante proteosomas. En la figura 22.4, se puede observar un diagrama donde se muestran los distintos componentes y función de un proteosoma.

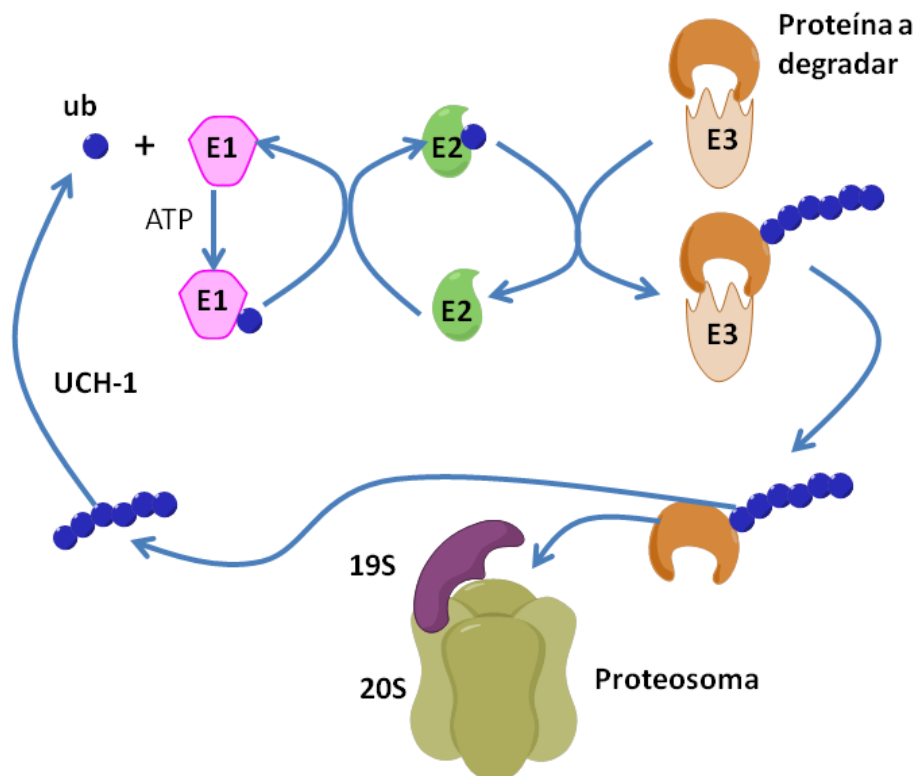


Figura 22.4. Secuencia de reacciones para que una proteína pueda ser degradada por un proteosoma.

Un proteosoma es un sistema de degradación de proteínas que se encuentran dañadas o envejecidas. Para que esto ocurra, la proteína en cuestión debe ser previamente modificada por unión de una cadena de ubiquitina, la cual impone la señal para ser degradada por este sistema. Una ubiquitina (ub) es un péptido de 76 aminoácidos que se une covalentemente mediante su grupo carboxílico terminal a grupo amino de una lisina de la proteína sustrato. Para llevar a cabo esta unión, se debe realizar una serie de pasos secuenciales. Primero, la enzima E1 (Enzima Activadora de Ubiquitina) activa a la ubiquitina mediante su unión mediante un enlace de tior, reacción en la que se necesita un ATP para llevarse a cabo. Luego, esta ubiquitina activada es transferida a E2 (Enzima conjugadora de ubiquitina), liberando a E1 para que pueda activar a otra ubiquitina. Luego, E2 con ubiquitina se une a E3 (Ubiquitin Ligasa) la cual se encuentra unida a la proteína que debe ser degradada, uniendo la ubiquitina activada y liberando a E2. Una vez generado este primer ciclo, se repite varias veces uniendo una ubiquitina tras otra, formando un polímero de ubiquitina en la proteína. Cuando esto se forma, la proteína puede ser degradada por el proteosoma. Este último consta de dos partes o subunidades: una tapa de un tamaño de 19S y un core formado por un complejo proteico de 20S. El core es básicamente un cilindro, abierto en los extremos cuya actividad proteolítica reside dentro de él. Las tapas de 19S se encuentran involucradas en el reconocimiento de los sustratos poliubiquitinilados, ayudando al despliegue y entrada de la proteína y de la separación de la cadena de poliubiquitina de la proteína. De esta forma, Parkin puede poseer un efecto protector degradando a α sin. Sin embargo, esto no ha sido totalmente demostrado debido a que cuando Parkin se encuentra mutado, los pacientes poseen disfunción mitocondrial y alto daño oxidativo, además de no poseer cuerpo de Lewy en las neuronas. Estudios recientes sugieren que Parkin tiene como sustratos para poliubiquitinar a

proteínas que se encuentran en las membranas externas de las mitocondrias, conduciendo a la autofagia de las mitocondrias dañadas. De esta forma, mutaciones en este gen, llevan a la pérdida del control de calidad de las mitocondrias, acumulándose mitocondrias despolarizadas que aumentan la producción de ROS contribuyendo a la muerte celular.

UCH-1

La Ubiquitin Carboxil terminal Hidrolasa-1 es una enzima que reconoce los puentes tioles de los polímeros de ubiquitina y lisandolos desde su extremo C-terminal. Así, esta enzima se encuentra encargada de separar las ubiquitinas para que puedan ser recicladas y puedan volver a ser activadas por E1. Mutaciones en este gen se asociación con enfermedad de Parkinson de herencia autosomica dominante. Aun no se conoce porque la simple disminución en la expresión en una de las dos copias de esta proteina genera esta patología.

Aunque la forma en que se produce la muerte de las neuronas aun no es clara, en la figura 22.5 se muestra un esquema donde se integran distintos mecanismos postulados.

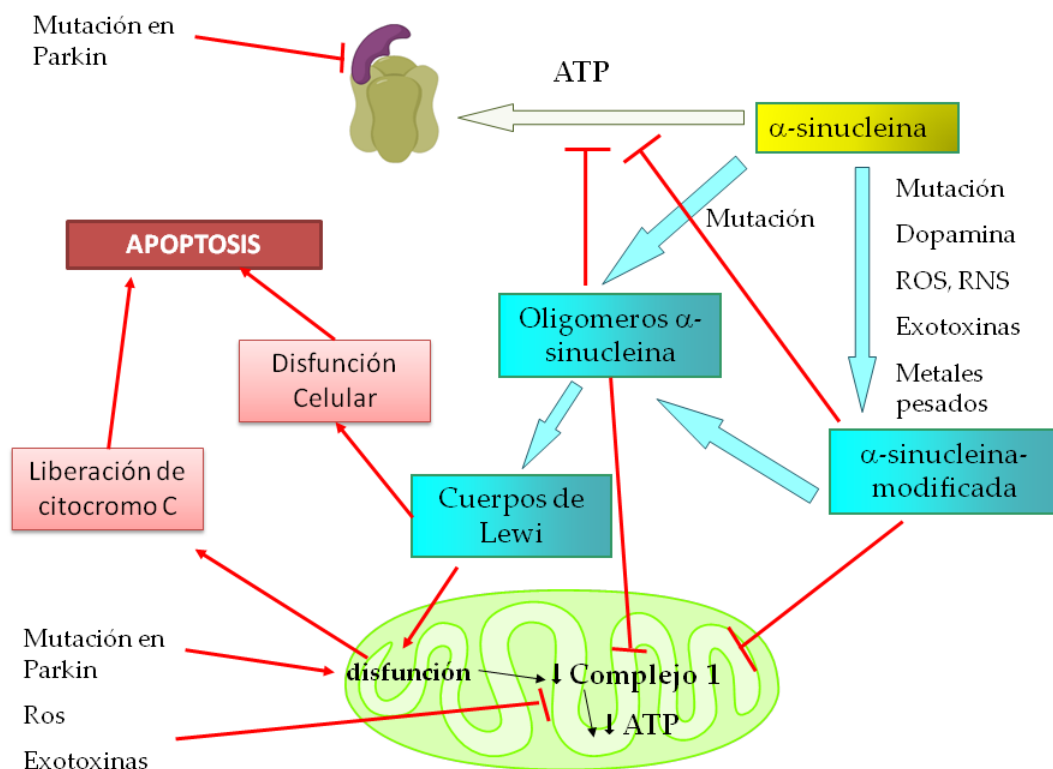


Figura 22.5. Esquema donde se muestra los distintos mecanismos posibles que producen la muerte neuronal.

La muerte neuronal puede dar inicio por varios puntos, uno de ellos es a partir de la modificación de la α sin, la cual puede ser alterada a su vez por distintos mecanismos. Por ejemplo, mutaciones en su gen que lleven a una menor velocidad de degradación o a que se libere de la membrana plasmática o multiplicación del gen, haciendo que aumente su concentración en el citosol y haciéndola

susceptible a distintas modificaciones, tales como la oxidación. A su vez, se ha observado que la dopamina (neurotransmisor de estas neuronas) pueden alterar la α sin o producir radicales libre en su proceso de degradación, lo cual podría llevar a una alteración en la α sin. Por otro lado, la presencia de neurotoxinas podría alterar también a esta proteína. Una vez que la α sin es modificada, esta puede producir inhibición de los proteosomas, haciendo que disminuya aún más su eliminación y por lo tanto, aumente su concentración, de esta forma la α sin modificada empieza a agregarse y formar oligómeros, teniendo ambas la capacidad de producir una disfunción mitocondrial. Cuando esto ocurre, se produce un desacoplamiento en la cadena respiratoria llevando a que disminuya la capacidad de producción de ATP, necesario para el correcto funcionamiento de los proteosomas, disminuyendo la capacidad de degradación aún mas y elevando los niveles de α sin. A medida que pasa el tiempo, dentro de la célula hay cada vez más oligómeros de α sin modificada, los cuales se unen a distintas sustancias citoplasmática y se agregan entre ellos formando así los cuerpos de Lewy. Estos cuerpos continúan interviniendo con la correcta función mitocondrial haciendo que desde las mitocondrias se libere citocromo C, el cual desencadena apoptosis. Además, los cuerpos de Lewy producen disfunción celular, lo que desencadena también la muerte de la neurona.

Otros mecanismos posibles de muerte celular ocurren a partir de la disfunción de las mitocondrias. Por ejemplo, una neurotoxina puede afectar a las neuronas interviniendo en la cadena respiratoria, disminuyendo la producción de ATP y/o aumentando la producción de radicales libre de oxígeno, cuando esto ocurre, se produce un aumento en los sustratos de los proteosomas o un aumento del estrés oxidativo desencadenando la muerte neuronal.

Algunos factores ambientales que se han catalogado como neurotoxinas asociadas a la enfermedad de Parkinson son el MPTP (metil fenil tetrahidropiridina), Paraquat y la Rotenona, además de los metales pesados, que presentan distintos mecanismos de toxicidad. El compuesto MPTP proviene de la síntesis de la heroína, de hecho, se descubrió que este compuesto producía esta enfermedad cuando un grupo de personas consumieron heroína y desarrollaron enfermedad de Parkinson rápidamente a temprana edad. Más tarde se demostró que en realidad, MPTP no es la causa la enfermedad, sino que su metabolito, el MPP⁺ (1 metil 4 fenil piridina) es el que posee un efecto neurotóxico. El MPP⁺ actúa a distintos niveles de la cadena transportadora de electrones inhibiendo la producción de ATP. El Paraquat es una amina cuaternaria usada como un herbicida, que produce altos niveles de estrés oxidativo durante el proceso de eliminación, mientras que la Rotenona es una sustancia que se utiliza como insecticida e inhibe al complejo 1 de la cadena respiratoria mitocondrial.

Diagnóstico

El diagnóstico se hace desde la clínica y basándose en el número y combinación de síntomas; va progresando desde un “posible” a un “probable” hasta un “definitivo”. Sin embargo, el diagnóstico de certeza solo es posible luego de la muerte del paciente, mediante una necropsia en la que se observa una disminución del número de neuronas y en aquellas que aún existen, cuerpos de Lewy en su interior. Aun así, estudios de imágenes tales como resonancia magnética nuclear o tomografía computada pueden ayudar al diagnóstico.

Tratamiento

El pronóstico de vida es de 5 años sin tratamiento. Los tratamientos actuales resultan ser de reemplazo de neurotransmisores y mejoras en la calidad de vida, sin poder curar la enfermedad, aunque es muy importante la adherencia a estos tratamientos dado que de esta forma la expectativa de vida de los pacientes alcanza los rangos normales.

La causa de muerte resulta de infección del aparato respiratorio o de las vías urinarias, dado a que los pacientes se encuentran mayormente postrados en sillas, sillones o camas lo que les produce escaras o úlceras, las cuales pueden infectarse y ocasionar la muerte. Además, debido a que se encuentran todo el tiempo encorvados y con malas posturas, se van comprometiendo las funciones de los distintos órganos por aplastamiento.

Parte del tratamiento está destinado a revertir la falta de dopamina. Para ello se administra L-Dopa, un precursor de la dopamina previo paso por la barrera hematoencefálica. A mediados de los años 60, se daban altas dosis de L-Dopa (alrededor de 7 gr/día), lo que producía algunos efectos adversos como vómitos, náuseas, mareos, trastornos mentales, etc. Estos son casi nulos cuando se administra Carbidopa (Fig. 22.6).

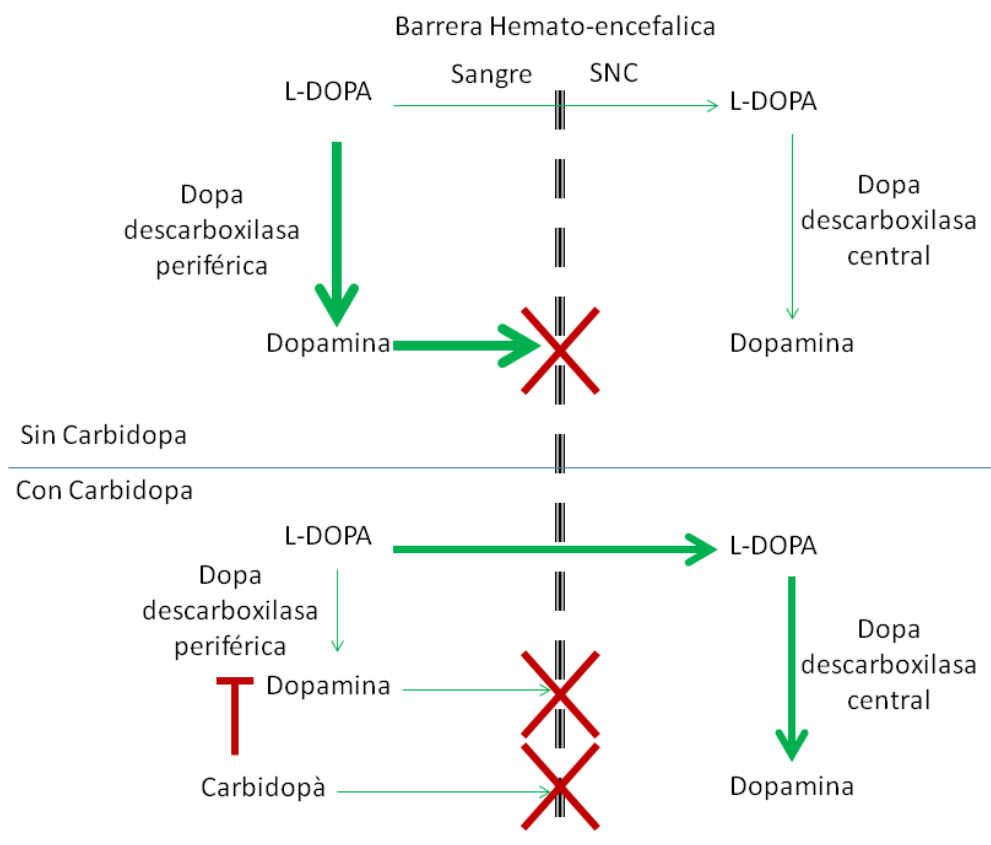


Figura 22.6. Mecanismo de acción de L-Dopa y Carbidopa.

La dopadescarboxilasa es la enzima encargada de convertir la L-Dopa a Dopamina. Esta enzima se expresa en el sistema nervioso central y otra forma se expresa a nivel periférico. Esta última es la que convierte la mayor cantidad de L-Dopa a Dopamina, dado que la dopamina no puede atravesar

la barrera hemato-encefálica, no se observan los efectos colaterales descritos. Carbidopa, es un fármaco que inhibe ambas enzimas dopa descarboxilasas, sin embargo, debido a que no puede cruzar la barrera hemato-encefálica, solo inhibe la enzima de expresión periférica. Con esta forma de tratamiento combinado se logra disminuir la dosis de DOPA a dos tomas diarias de 50 mg, disminuyendo considerablemente los efectos secundarios de esta droga. La mejoría inicial es variable, la cual puede durar entre 2 a 3 años, luego debido a que los tratamientos no detienen la muerte neuronal, esta prosigue haciendo que la dosis de L-Dopa administrada deba ser reajustada. A estos tratamientos farmacológicos se suman la fisioterapia y distintas drogas antidepressivas para animarlos a los movimientos y así disminuir la aparición de escaras o úlceras en la piel.

Referencias

- Atri A. The Alzheimer's disease clinical spectrum. Diagnostic and Management. *Med Clin N Am* 2019 (103) 263.
- Barage, SH; Sonawane, KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 2015 (52) 1-18.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Ubiquitin–proteasome system and Parkinson's diseases. *Experimental Neurology* 2005 (191) S17–S27.
- Cacace R. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer & Dementia* 12 (2016) 733-748.
- Cummings JL. Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine* 2004 (351) 56.
- Dawson TM. Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Science* 2003 (302) 819.
- Franklin HE. Molecular Basis of the Neurodegenerative Disorders. *The New England Journal of Medicine*. 1999 (340) 1970.
- Giasson B Lee VM. Are Ubiquitination Pathways Central to Parkinson's Disease? *Cell* 2003 (114) 1.
- Kalia LV, Lang AE. Parkinson's Disease. *Lancet* 2015 (386) 896.
- McGirr, S; Venegas, C; Swaminathan, A. Alzheimer Disease: a Brief Review. *J. Exp Neurol.* 2020, 3; 89-98.
- Sando SB, Melquist S, Cannon A, Hutton ML, Sletvold O, Saltvedt I, White LR, Lydersen S and Aasly JO. APOE 4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; A case control study from central Norway. *BMC Neurology* 2008 (8) 9.
- Scriver, C. R; Beaudet, A. L; Sly, W. S; Valle, D.; Childs, B.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. *The Metabolic and Molecular base of inherited disease*. McGraw-Hill Medical Publishing Division; 8th edition (2001).
- Seirafi M, Kozlov G, Gehring K. Parkin structure and function. *FEBS J* 2015 (282) 2076.
- Valente EM, Arena G, Torosantucci L, Gelmetti V. Molecular pathways in sporadic PD. *Parkinsonism and Related Disorders* 2012 (1851) 571.
- Van Marum RJ. Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2008 (22) 265.

Los autores

Coordinadora

Cortizo, Ana María

Doctor en Ciencias Bioquímicas (orientación Análisis Clínicos)-Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Profesor Titular-ordinario-Dedicación Exclusiva, Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Investigador Principal de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia (CICPBA) de Buenos Aires.

Director del LIOMM (Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral)-UNLP-Centro Asociado CICPBA

Autores

Bozzo, Walter

Licenciado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

Ex Residente en Citogenética Clínica, Instituto Nacional de Genética Médica.

Especialista en Genética Humana orientación Citogenética, Sociedad Argentina de Genética (no revalidado actualmente),

Perito Genetista, Laboratorio de Análisis Comparativo de ADN, Asesoría Pericial Departamental La Plata, Suprema Corte de Justicia de la Provincia de Buenos Aires (con licencia actualmente).

Director Técnico de Hereditas – Laboratorio de Genética Clínica, La Plata

Especialista en Genética Forense, Sociedad Argentina de Genética Forense.

Profesor Libre Ad-honoren de la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

Subdirector Técnico del Banco Nacional de Datos Genéticos, Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología de la Nación.

Chuguransky, Sara Rocio

Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Ayudante diplomado-ordinario-Dedicación Simple, Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Di Virgilio, Ana Laura

Doctorado en Ciencias Naturales, Institut fuer Arbeitphysiologie, Universidad de Dortmund, Dortmund, Alemania.

Ayudante diplomado-ordinario-Dedicación Semiexclusiva, Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Investigador Adjunto del CONICET. Lugar de trabajo: Cátedra de Bioquímica Patológica- CE-QUINOR, FCE, UNLP

Fernández, Juan Manuel

Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Ayudante diplomado-ordinario-Dedicación Simple, Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Investigador Adjunto del CONICET. LIOMM (Laboratorio de Investigaciones en Osteopatias y Metabolismo Mineral)-UNLP-Centro Asociado CICIPBA.

McCarthy, Antonio Desmond

Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Profesor Titular-ordinario-Dedicación semiexclusiva, Cátedra de Química Clínica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Co-Director del LIOMM (Laboratorio de Investigaciones en Osteopatias y Metabolismo Mineral)-UNLP-Centro Asociado CICIPBA.

Jefe de Sala del Laboratorio (por concurso), Hospital Zonal General de Agudos “H. Cestino” de Ensenada, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires.

Enfermedades metabólicas hereditarias : bases bioquímicas, moleculares, diagnóstico y tratamiento / Ana María Cortizo ... [et al.] ; coordinación general de Ana María Cortizo. - 1a ed - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; EDULP, 2021.
Libro digital, PDF/A - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-950-34-1978-6

1. Salud. 2. Enfermedades Metabólicas. 3. Bioquímica. I. Cortizo, Ana María, coord.
CDD 616.0756

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina
+54 221 644 7150
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edupl integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2021
ISBN 978-950-34-1978-6
© 2021 - Edulp

e
exactas

**Edulp**
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA