



172ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES LISOSÓMICAS
POR DEPOSITO EN EL SISTEMA NERVIOSO,
CONOCIDAS COMO ESFINGOLIPIDOSIS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

MARIA DE LOURDES GALVAN RUIZ

DIRECTORA DE TESIS:

Q. F. B. IDALIA AVILA MIYAZAWA

FALLA DE ORIGEN



V N A M

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Abreviaturas

Resumen

| | |
|-------------------|---|
| Introducción..... | 1 |
| Objetivos..... | 3 |

1. GENERALIDADES

| | |
|--|----|
| 1.1 Estructura y función de los lisosomas..... | 4 |
| 1.2 Bioquímica de los Esfingolípidos..... | 5 |
| 1.3 Función de los Glucoesfingolípidos..... | 10 |
| 1.4 Relación entre alteración lisosomal y degradación de esfingolípidos. | 11 |
| 1.5 Sistema Nerviosos..... | 11 |
| 1.6 Estructura de sostén del Sistema Nerviosos..... | 12 |

2. ENFERMEDADES LISOMICAS POR DEPOSITO DE ESFINGOLIPIDOS

2.1 Enfermedad de Gaucher.

| | |
|-----------------------------------|----|
| 2.1.1 Historia..... | 14 |
| 2.1.2 Definición..... | 14 |
| 2.1.3 Patofisiología..... | 15 |
| 2.1.4 Sintomatología Clínica..... | 26 |
| 2.1.5 Incidencia..... | 28 |
| 2.1.6 Pronóstico..... | 29 |
| 2.1.7 Diagnóstico..... | 29 |

2.2 Enfermedad de Niemann-Pick.

| | |
|-----------------------------------|----|
| 2.2.1 Historia..... | 31 |
| 2.2.2 Definición..... | 31 |
| 2.2.3 Patofisiología..... | 31 |
| 2.2.4 Sintomatología Clínica..... | 43 |
| 2.2.5 Incidencia..... | 45 |
| 2.2.6 Pronóstico..... | 45 |
| 2.2.7 Diagnóstico..... | 45 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.3 | Gangliosidosis (GM ₁ , GM ₂). | |
| 2.3.1 | Historia..... | 48 |
| 2.3.2 | Definición..... | 48 |
| 2.3.3 | Patofisiología..... | 48 |
| 2.3.4 | Sintomatología Clínica..... | 55 |
| 2.3.5 | Incidencia..... | 59 |
| 2.3.6 | Pronóstico..... | 59 |
| 2.3.7 | Diagnóstico..... | 59 |
| 2.4 | Sulfatidosis (Leucodistrofia Metacromática). | |
| 2.4.1 | Historia..... | 61 |
| 2.4.2 | Definición..... | 61 |
| 2.4.3 | Patofisiología..... | 62 |
| 2.4.4 | Sintomatología Clínica..... | 69 |
| 2.4.5 | Incidencia..... | 71 |
| 2.4.6 | Pronóstico..... | 71 |
| 2.4.7 | Diagnóstico..... | 71 |
| 2.5 | Enfermedad de Fabry. | |
| 2.5.1 | Historia..... | 73 |
| 2.5.2 | Definición..... | 73 |
| 2.5.3 | Patofisiología..... | 73 |
| 2.5.4 | Sintomatología Clínica..... | 79 |
| 2.5.5 | Incidencia..... | 80 |
| 2.5.6 | Pronóstico..... | 80 |
| 2.5.7 | Diagnóstico..... | 80 |
| 2.6 | Enfermedad de Krabbe (Leucodistrofia Globoide Celular). | |
| 2.6.1 | Historia..... | 81 |
| 2.6.2 | Definición..... | 82 |
| 2.6.3 | Patofisiología..... | 82 |
| 2.6.4 | Sintomatología Clínica..... | 88 |
| 2.6.5 | Incidencia..... | 90 |
| 2.6.6 | Pronóstico..... | 90 |
| 2.6.7 | Diagnóstico..... | 90 |

3. PRUEBAS DE LABORATORIO

| | |
|---|-----|
| 3.1 Fosfatasa Acida. | |
| 3.1.1 Fundamento..... | 92 |
| 3.1.2 Materiales y método..... | 92 |
| 3.2 Análisis de Sedimento Urinario. | |
| 3.2.1 Fundamento..... | 93 |
| 3.2.2 Materiales y método..... | 93 |
| 3.2.3 Cromatografía en Capa Fina..... | 94 |
| 3.3 Diagnóstico de la Enfermedad de Gaucher y Niemann-Pick en pequeña muestra de sangre venosa. | |
| 3.3.1 Fundamento..... | 95 |
| 3.3.2 Materiales y método..... | 96 |
| 3.4 Diagnóstico Histológico diferencial de esfingolipidosis. | |
| 3.4.1 Fundamento..... | 97 |
| 3.4.2 Materiales y método..... | 97 |
| 3.4.3 Fijación de Tejidos..... | 99 |
| 3.4.4 Tinciones..... | 101 |
| 3.5 Cultivo de Fibroblastos..... | 109 |
| 3.6 Colesterol. | |
| 3.6.1 Fundamento..... | 109 |
| 3.6.2 Materiales y método..... | 109 |
| 3.7 Cromatografía de Intercambio Iónico..... | 110 |
| 3.8 Electroforesis en gel-almidón. | |
| 3.8.1 Fundamento..... | 110 |
| 3.8.2 Materiales y método..... | 111 |

| | |
|--|-----|
| 3.9 Diagnóstico de la Leucodistrofia Metacromática. | |
| 3.9.1 Prueba de tinción metacromática..... | 112 |
| 3.9.2 Prueba de tinción con violeta rápido de cresilo..... | 112 |
| 3.9.3 Prueba de sulfatasa A en orina..... | 112 |
| 3.10 Preparación de Leucocitos y Fibroblastos..... | 114 |
| 3.11 Ensayos enzimáticos..... | 115 |
| 3.12 Radiomarcado de galactosilesfingosina en el diagnóstico de la E.K.... | 116 |
| 4. Conclusiones..... | 118 |
| 5. Bibliografía y Hemerografía..... | 119 |

A B R E V I A T U R A S

| | |
|-----------------|---|
| Å | Angstrom |
| ACAT | Acil-CoA-colesterol-acil-transferasa |
| Apo-A | Apoproteína A |
| Apo -I | Apoproteína A-I |
| Apo-B | Apoproteína B |
| Apo-E | Apoproteína E |
| aprox. | aproximadamente |
| ASA | arilsulfatasa A |
| ASB | arilsulfatasa B |
| ASC | arilsulfatasa C |
| ATP | Adenosin-trifosfato |
| °C | grados centígrados |
| ¹⁴ C | carbono 14 |
| CBE | Conduritol-beta-epóxido |
| Cer | ceramida |
| cm | centímetros |
| CM | Carboximetilcelulosa |
| CoA | coenzima A |
| cpm | centelleos por minuto |
| CSF | Fluido cerebroespinal |
| DEAE | Dietilaminoetileno |
| E.F. | Enfermedad de Fabry |
| E.G. | Enfermedad de Gaucher |
| E.K. | Enfermedad de Krabbe |
| E.N.P. | Enfermedad de Niemann-Pick |
| E.S. | Enfermedad de Sandhoff |
| Fig. | Figura |
| g | gramos |
| GA ₁ | Derivado de Gangliósido GM ₁ |
| GA ₂ | Derivado de Gangliósido GM ₂ |
| Gal | Galactosa |
| GalNAc | N-acetil-galactosamina |
| GL ₁ | Glucosil-ceramida |
| Glu | Glucosa |

| | |
|--------------|--|
| ^3H | Tritio |
| HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| HDLc | Lipoproteína de alta densidad rica en colesterol |
| hex A | hexosaminidasa A |
| hex B | hexosaminidasa B |
| HMG CoA | 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA |
| HNP | 2-N-acilamido-4-nitrofenil-fosforilcolina |
| hrs | horas |
| IL-I | Interleucina I |
| Kg | Kilogramo |
| LAF | Factor activador de linfocito |
| LACT | lecitin-colesterol-aciltransferasa |
| LDH | Lactato-deshidrogenasa |
| LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| L.M. | Leucodistrofia Metacromática |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| M | Molaridad |
| min | minuto |
| mg | miligramos |
| ml | mililitros |
| mM | milimoles |
| 4-MUS | 4-metilumbelliferilsulfato |
| N | Normalidad |
| NANA | N- acetil-neuramínico |
| nm | nanómetro |
| nmol | nanomol |
| PAS | ácido-para-aminosalicílico |
| PBS | Buffer de fosfato salino |
| PMN | polimorfonucleares |
| pNCS | para-nitrocatecolsulfato |
| p/v | peso/volumen |
| p.s. | peso seco |
| REL | Reticulo Endoplásmico Liso |
| RER | Reticulo Endoplásmico Rugoso |
| rpm | revoluciones por minuto |
| s | unidades Svedberg |

seg

SNA

SNC

SNP

T.S.

UDP-Gal

UDP-Glu

v/v

segundo

Sistema Nervioso Autónomo

Sistema Nervioso Central

Sistema Nervioso Periférico

Tay-Sachs

Galactosa-uracil-difosfato

Glucosa-uracil-difosfato

volumen/volumen

R E S U M E N .

De acuerdo a la investigación realizada se tiene que las enfermedades ocasionadas por depósito de lípidos en células del Sistema Nervioso y de otros órganos es debida a una deficiencia a nivel lisosomal para producir enzimas con actividad normal que degradan el sustrato específico, y como consecuencia se acumulan los lípidos dentro de lisosomas; por lo que pueden distinguirse siete esfingolipidosis principales:

- Enfermedad de Gaucher por deficiencia de glucocerebrosidasa
- Enfermedad de Niemann-Pick por deficiencia de esfingomielinasa
- Gangliosidosis (GM₁) por deficiencia de beta-galactosidasa A y B
- Gangliosidosis (GM₂), enfermedad de Tay-Sachs por deficiencia de hexosaminidasa A y B
- Leucodistrofia Metacromática por deficiencia de arilsulfatasa A
- Enfermedad de Fabry por deficiencia de alfa-galactosidasa
- Enfermedad de Krabbe por deficiencia de galactosilceramida-beta-galactosidasa.

El estudio de cada una de ellas se deriva de las investigaciones realizadas inicialmente en la enfermedad de Gaucher, en donde no fué fácil identificar a la enzima que provocaba el problema y además establecer el diagnóstico diferencial. Sin embargo, hasta el momento es la enfermedad (provocada por almacén de lípidos) más estudiada, por lo que se ha podido establecer que son tres los tipos dentro de ésta enfermedad, apareciendo las manifestaciones clínicas desde la infancia, teniendo un progreso más rápido los Tipos 2 y 3, con un promedio de vida que no rebasa la infancia; encontrándose lo contrario en el Tipo 1, pues mientras no existan complicaciones con otros órganos es posible la sobrevivencia inclusive hasta la edad adulta y donde es recomendable la práctica de esplenectomía. En los tres casos existe daño mínimo a nivel de Sistema Nervioso, el cual puede pasar sin trascendencia, pues no desarrolla alteración neurológica. El almacén de glucocerebrósidos principalmente en macrófagos permite caracterizar la célula de Gaucher que ayuda al diagnóstico de la enfermedad.

La segunda enfermedad estudiada es la de Niemann-Pick, que presenta acúmulo

mulo de esfingomielina. Se conocen cinco Tipos de enfermedad; dentro de los cuales existe en los Tipos: A, C y D daño neurológico y en los dos restantes - esto no aparece. Aunque en los cinco existe la característica de presentarse células espumosas en médula ósea y sistema fagocítico mononuclear. La característica diferencial que se tenía era la aparición de una mancha rojo-cereza en el fondo del ojo, como consecuencia del daño al epitelio y no al almacén de lípidos; pero ésta no es exclusiva de la E.N.P.

Debido a que la esfingomielina es una sustancia importante en el Sistema Nervioso, se tiene que el daño ocasionado es irreversible, aunque se plantea - que existe el efecto del colesterol hacia la enzima esfingomielinasa provocando la inhibición de la función enzimática. La célula de Niemann-Pick se presenta como característica diferencial de la enfermedad.

La Gangliosidosis afecta principalmente neuronas. Para su estudio se divide en:

- GM₁ Tipo 1: Gangliosidosis Infantil
- GM₁ Tipo 2: Gangliosidosis Juvenil
- GM₂ Tipo 1: Enfermedad de Tay-Sachs
- GM₂ Tipo 2: Enfermedad de Sandhoff
- GM₂ Tipo 3: Juvenil

Caracterizándose todas por presentar alteración en Sistema Nerviosos y -- Oseo; aunque puede aparecer daño generalizado en otros órganos. De acuerdo al Tipo de enfermedad que se presente, es el período de vida de los pacientes. - La neurona presenta cuerpos citoplasmáticos membranosos como consecuencia de la acumulación de gangliósidos, que ayudan a la identificación de la enfermedad; así como desmielinización en la GM₂ con aparición de mancha rojo-cereza en el fondo del ojo. La muerte se produce generalmente por bronconeumonía.

En la Sulfatidosis se observa pérdida de mielina en nervios periféricos y SNC; presentándose tres tipos de esta enfermedad:

- Leucodistrofia Metacromática Infantil Tardía
- Leucodistrofia Metacromática Juvenil
- Leucodistrofia Metacromática Adulta

El acúmulo de material metacromático procedente de lípidos ácidos (sulfá-

tidos) causa la metacromasia que se presenta en las células afectadas. Existe deterioro neurológico progresivo y la muerte sobreviene máximo en el período - adulto joven.

La enfermedad de Fabry presenta depósitos de galactosil-galactosilgluco--silceramida especialmente en células de riñón, pero también se observan en nervios periféricos y centrales que ocasiona síntomas neurológicos. Las lesiones cutáneas es otra característica; así como afección del sistema circulatorio. - Esta enfermedad es poco común, predominando en mujeres. El período de vida se puede prolongar hasta los 50 años.

En la enfermedad de Krabbe, se presenta acúmulo de galactosilceramida - (procedente de la mielina catabolizada) por la escasez de enzima. Los cambios patológicos importantes están limitados al Sistema Nervioso. Existe deficiencia de mielina. Los pacientes no sobreviven más de los dos primeros años de vida. Es la enfermedad más rara que se conoce y en realidad es la menos estudiada.

La elaboración de una adecuada historia clínica, es de suma importancia , pues la hepatoesplenomegalia, afección del sistema nervioso y otros, va marcando la pauta aunque no definitiva para poder realizar pruebas que ayuden al -- diagnóstico. Dentro de estas pruebas se tienen varias que no se manejan en el laboratorio clínico de rutina, pues están orientadas hacia hospitales. Sin embargo, la determinación de bilirrubinas, colesterol, creatinina, análisis de - sedimento urinario, fosfatasa ácida son pruebas auxiliares que si se pueden -- realizar a nivel clínico, considerando que son complementarias y no definiti--vas como para dar un diagnóstico certero:;

Las técnicas de tinción para diferenciar cada una de las enfermedades es de gran valor, pues se ha podido establecer un cuadro diferencial (ver Tabla 7) aunque este análisis es cualitativo es de gran ayuda; sólo que se debe tomar - en cuenta que es necesario tener habilidad para la toma de biopsias y estudio de las mismas, ya que en ocasiones se maneja la microscopía electrónica.

Sin embargo, el manejo de técnicas enzimáticas es más recomendable por su alta especificidad, pues se estudia el comportamiento de la enzima sobre el - sustrato que debe marcarse previamente, aunque se pueden presentar problemas - respecto al manejo de dicha prueba, ya que la sensibilidad de las enzimas a - cambios de temperatura o sustratos mal marcados condiciona a tener errores en la determinación, Debiendo considerar que el uso de sustratos naturales es --

más recomendable en comparación con los artificiales; no obstante, éstos últimos se usan en forma cotidiana con excepción de la enfermedad de Krabbe donde hasta el momento se sigue estudiando la sustancia que podría servir como sustrato. Hay que recordar que los ensayos con sustratos cromogénicos o fluorogénicos en general, son procedimientos difíciles de seguir y requieren el uso de equipo especial.

También se puede contar con el empleo de técnicas cromatográficas ya sea en placa o por intercambio iónico, debido a que se presentan en algunas enfermedades isoenzimas, para lo cual se facilita el empleo de este método, que puede ser semicuantitativo. Apoyándose en la utilización de electroforesis también se obtienen resultados satisfactorios.

Por otro lado, se tiene que el estudio de dichas enfermedades se presenta principalmente en judíos; sin embargo, la distribución actualmente se encuentra por todo el mundo, inclusive en México, aunque no se puede considerar una enfermedad común en nuestro país se han estudiado principalmente: enfermedad de Gaucher, Niemann-Pick y Gangliosidosis, aplicando ensayos enzimáticos con sustratos fluorogénicos (4-metilumbeliferil-2-desoxi-beta-D-glucopiranosido). El número de pacientes estudiados fué aprox. 2,000; aunque el estudio se realizó con fines solamente demostrativos, pues no se están aplicando técnicas terapéuticas hasta el momento, dicho estudio se efectuó en el "Centro Médico La Raza".

I N T R O D U C C I O N .

El concepto de enfermedades por depósito lisosomal comprende más de 25 trastornos diferentes con características bioquímicas propias. No son muy frecuentes, pero revisten gran interés conceptual, al tiempo que la detección de la enfermedad abre posibilidades terapéuticas futuras muy interesantes [30].

Los lisosomas son organelos intracitoplasmáticos que encierran un ambiente ácido; contienen enzimas hidrolíticas que degradan las macromoléculas ya utilizadas, en relación con el recambio normal de los tejidos [16].

Las vacuolas citoplasmáticas que contienen el sustrato (material que debe ser degradado) se funde con los lisosomas, dando lugar a lo que se denomina "lisosomas secundarios". De esta forma, la célula está fuera del alcance de los citados sistemas hidrolíticos; pero los materiales producidos por la actividad lisosómica vuelven al citoplasma celular para ser reutilizados por él [16, 30, 58].

Cuando existe deficiencia genética en alguna de las enzimas lisosómicas, los lisosomas secundarios siguen creciendo por la llegada de nuevo material, que al no poder ser degradado normalmente, se acumula en ellos, dando lugar a la enfermedad por depósito lisosomal [44].

Las enfermedades lisosómicas por depósito incluyen a la mayoría de trastornos por depósito de lípidos denominados: mucopolisacaridosis; mucopolipidosis; fosfolipidosis; esfingolipidosis; enfermedades por depósito de glucoproteínas, y otras [23, 44].

Las esfingolipidosis figuran entre las enfermedades más frecuentes y mejor conocidas; en ellas se piensa cuando se habla de sobrecarga lipídica. Los grandes pilares dentro de las enfermedades lisosómicas por depósito han sido: la Enfermedad de Gaucher, por sobrecarga de glucocerebrósidos; la Enfermedad de Niemann-Pick, por sobrecarga de esfingomielinas y la Enfermedad de Tay-Sachs por sobrecarga de gangliósidos. Se ha comprendido mal durante mucho tiempo el por qué se observa la mancha rojo-cereza en el fondo del ojo de un cierto número de personas que padecían la enfermedad de Tay-Sachs o de Niemann-Pick, siendo muy frecuentes particularmente entre un determinado grupo de judíos, e ignorando que este signo obedecía a una atrofia macular y no a la sobrecarga lipídica misma; se ha supuesto que la enfermedad de Niemann-Pick sería una forma generalizada de la enfermedad de Tay-Sachs, hipótesis difícilmente aceptada al existir dos tipos de material bioquímico diferente [23].

Con el descubrimiento de Brady, del déficit de glucocerebrósidas en la enfermedad de Gaucher y de esfingomielinasa en la enfermedad de Niemann-Pick, el giro enzimático se había dado, debiendo individualizar las esfingolipidosis en base a los datos clínicos; al material de sobrecarga y a las anomalías enzimáticas. Actualmente la lista de enfermedades se ha ampliado debiendo señalar a la Gangliosidosis, la Leucodistrofia Metacromática y la Enfermedad de Fabry.

Debido a que la información acerca de las esfingolipodistrofias se encuentra en forma aislada, el presente texto da un enfoque más amplio sobre dichas enfermedades; haciendo énfasis en la alteración enzimática específica, así como las manifestaciones clínicas y pruebas de laboratorio diferenciales para la identificación de cada enfermedad.

O B J E T I V O S .

1. Mencionar las alteraciones metabólicas (enzimáticas) presentes en - las esfingolipidosis en estudio.
2. Diferenciar cada una de las enfermedades por la sintomatología carac terística que presentan.
3. Describir las pruebas de laboratorio disponibles para detectar el ti po de esfingolipidosis, así como ventajas y desventajas de dichas prue-
bas.

1. GENERALIDADES

1.1 ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS LISOSOMAS.

Los lisosomas son organelos esenciales para la función celular; se encuentran dispersos en el citoplasma. Proporcionan un sistema digestivo intracelular que permite que la célula digiera y, por lo tanto, suprima sustancias y estructuras innecesarias, especialmente estructuras lesionadas o extrañas como las bacterias. Los lisosomas tienen 250-750 nm de diámetro, son rodeados por una membrana unitaria. Están llenos de gran número de pequeños gránulos de 5-8 nm de diámetro, que son agregados proteínicos de enzimas hidrolíticas (digestivas) y actúan con máxima intensidad a pH ácido; el interior del lisosoma mantiene un pH aproximado de 4.5, gracias a la bomba de protones dependiente del Adenosintrifosfato (ATP), [1, 8].

Las enzimas lisosómicas son glucoproteínas que se sintetizan en el Retículo Endoplásmico Rugoso (RER) y se procesan conforme lo atraviezan; la adición de residuos de manosa-6-fosfato es un proceso fundamental en esta vía de síntesis. Los receptores de la manosa-6-fosfato se localizan en zonas específicas del lisosoma, y fijan las enzimas marcadas con dicha sustancia. A medida que se forma el nuevo organelo, las enzimas lisosómicas se van incorporando [1].

Una enzima hidrolítica es capaz de desintegrar un compuesto orgánico en dos o más partes, combinando el hidrógeno de una molécula de agua con parte del compuesto, y la porción OH de dicha molécula con el resto del mismo. La membrana que rodea al lisosoma evita que las enzimas hidrolíticas incluidas en él, entren en contacto con otras sustancias de la célula. Sin embargo, diversas situaciones en la célula pueden romper las membranas de algunos lisosomas permitiendo la liberación de enzimas. Estas enzimas luego desintegran sustancias orgánicas con las cuales entran en contacto, transformándolas en sustancias de molécula menor y muy difusibles [1, 9].

Los lisosomas primarios, corpúsculos originales que se derivan del Aparato de Golgi, pueden fusionarse con otras vesículas limitadas por membranas (vacuolas) para formar lisosomas secundarios; éstos contienen material que se deriva del exterior de la célula a través de endocitosis o material intracelular que incorporan por autofagia (Fig. 1). Los lisosomas, por tanto, degradan macromoléculas ya utilizadas, en relación con el recambio y remodelación normal

de los tejidos.

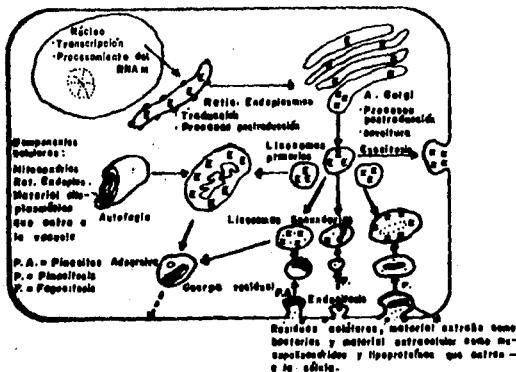


Fig. 1. Biología de los lisosomas.

1.2 BIOQUIMICA DE LOS ESFINGOLIPIDOS.

LIPIDOS.

Los lípidos son biomoléculas orgánicas insolubles en agua, que pueden extraerse de las células y tejidos mediante disolventes no polares. Existen diferentes familias o clases de lípidos, pero las propiedades distintas de todos ellos derivan de la naturaleza hidrocarbonada de la porción principal de su estructura. Siendo la clasificación más satisfactoria, aquella que se basa en las estructuras de los esqueletos, teniendo:

LIPIDOS COMPLEJOS:

Que se caracterizan porque contienen ácidos grasos como componentes unidos (por covalencia) a los esqueletos fundamentales. Son saponificables.

LIPIDOS SIMPLES:

No contienen ácidos grasos y por tanto, no son saponificables.

Aunque los ácidos grasos se encuentran en cantidades muy grandes como componentes en las células y tejidos, en estado libre (no esterificado) aparecen solamente trazas. Se han aislado aproximadamente 100 clases diferentes de ácidos.

dos grasos procedentes de diversos lípidos animales; vegetales y microorganismos. Todos ellos poseen una cadena hidrocarbonada larga (saturada o insaturada), con un grupo carboxilo terminal (COOH). Pueden hacerse algunas generalizaciones sobre los diferentes ácidos grasos; los más abundantes poseen un número par de átomos de carbono, con cadenas de longitudes comprendidas entre 14 y 22 átomos, aunque predominan los de 16 y 18 átomos de carbono [30, 50].

ESFINGOLÍPIDOS.

Los esfingolípidos pertenecen al grupo de los lípidos complejos, sus componentes básicos característicos son:

- Una molécula de ácido graso
- Una molécula de esfingosina o uno de sus derivados
- Un grupo de cabeza polar

La esfingosina que constituye el sillar de construcción característico de los esfingolípidos, se forma a partir del palmitoil-CoA por la siguiente secuencia de reacciones enzimáticas; y el compuesto resultante que posee dos colas - no polares se llama ceramida (Fig. 2), que es la estructura originaria de todos los esfingolípidos [44]:

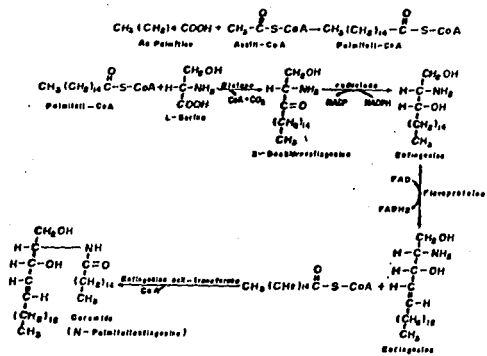


Fig. 2. Formación de Esfingosina y Ceramida.

Al grupo hidroxilo de la posición 1 de la base esfingosina (ver Fig. 2), se unen diferentes grupos de cabeza polar, para formar la variedad de esfingolípidos existentes, (Fig. 3); [58].

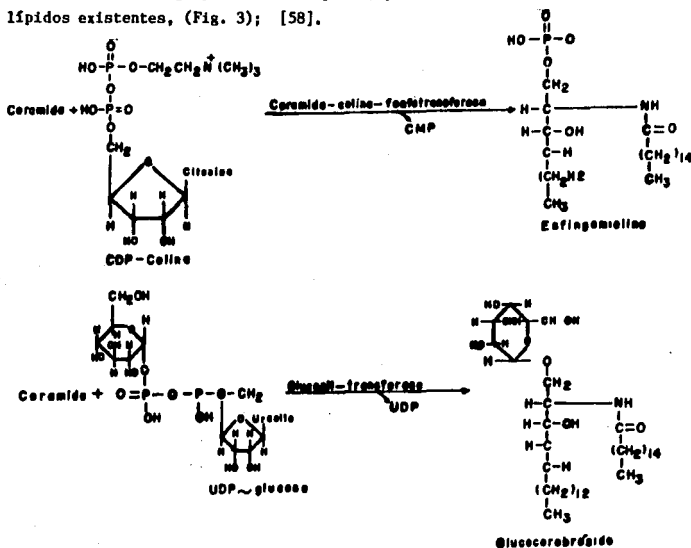


Fig. 3. Formación de diferentes Esfingolípidos (Esfingomielina y Glucocerebrósido).

Los esfingolípidos son componentes importantes de las membranas de células vegetales y animales, encontrándose grandes cantidades en los siguientes tejidos: NERVIOSO; donde la membrana de mielina que rodea ciertos nervios puede llegar a contener hasta 75% de lípidos, y CEREBRAL. Sólo existen trazas en las grasas de depósito [44, 58].

ESFINGOMIELINAS.

Son los esfingolípidos más abundantes en los tejidos animales superiores, contienen: fosforil-etanolamina o fosforil-colina como grupos de cabeza polar esterificados al grupo hidroxilo 1 de la ceramida (Fig. 3) [58].

GLUCOESFINGOLIPIDOS NEUTROS.

Son una segunda clase de esfingolípidos con uno o más restos de azúcar neutro como grupos de cabeza polar y que no poseen, por tanto, carga eléctrica. Los más sencillos son los cerebrósidos, que contienen como grupo de cabeza polar un monosacárido unido mediante enlace beta-glucosídico al grupo hidroxilo de la ceramida (Fig. 3). Los cerebrósidos del cerebro y del sistema nervioso contienen D-galactosa y por ello reciben el nombre de galactocerebrósidos; están presentes aunque en cantidades mucho menores en tejidos no neuronales; debido a que generalmente contienen D-glucosa en lugar de D-galactosa, reciben el nombre de glucocerebrósidos [58].

Los ésteres sulfúricos de los galactocerebrósidos (en la posición 3 de la D-galactosa) se encuentran también presentes en el tejido cerebral, y reciben el nombre de sulfátidos. Los cerebrósidos y sulfátidos contienen ácidos grasos, normalmente de 22 a 26 átomos de carbono [58].

Los glucoesfingolípidos que poseen disacáridos como cabeza polar se llaman dihexósidos, conociéndose también trihexósidos y tetrahexósidos, que contienen tri- y tetra-sacáridos respectivamente. Existiendo varias clases de glucoesfingolípidos neutros, siendo los principales los que a continuación se encuentran en la Tabla 1, [58].

| MONOSACÁRIDOS | |
|----------------|---------------------|
| Monosacáridos: | Gal 1-4-Glc 1-3-Cer |
| - D-Galactosa: | Gal 1-4-Glc 1-3-Cer |
| - D-Glucosa: | Gal 1-4-Glc 1-3-Cer |
| - D-Galactosa: | Gal 1-4-Glc 1-3-Cer |
| DISACÁRIDOS | |
| Disacáridos: | Gal 1-4-Glc 1-3-Cer |
| - D-Galactosa: | Gal 1-4-Glc 1-3-Cer |

Tabla 1. Clases principales de Esfingolípidos.

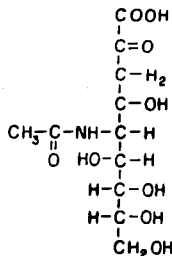
Los glucoesfingolípidos neutros son componentes importantes de la superficie celular de los tejidos animales. Las colas no polares penetran en la estructura de la bicapa lipídica de las membranas celulares, mientras que las cabezas polares emergen al exterior de la superficie. Algunos de los esfingolí-

pidos se encuentran en la superficie de los eritrocitos, confiriéndoles especificidad de grupo sanguíneo [44].

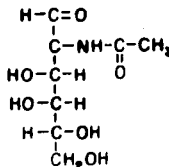
GLUCOESFINGOLIPIDOS ACIDOS.

El tercer grupo de los esfingolípidos, el más complejo, está integrado por gangliósidos. En sus grupos de cabeza polisacárida contienen uno o más restos de ácido siálico, lo cual confiere a la cabeza polar una carga negativa neta [58].

El ácido siálico que comunmente se encuentra en los gangliósidos humanos es el N-acetilneuramínico (Fig. 4).



Acido N-acetilneuramínico
(NANA)



N-acetil-D-galactosamina
(GalNAc).

Fig. 4. Estructura de dos restos de Ac. siálico.

Los gangliósidos abundan en la materia gris del cerebro, donde constituyen el 6% de los lípidos totales, pero también se encuentran en distintos tejidos nerviosos. Se han identificado 20 tipos diferentes de gangliósidos, que difieren en el número y posiciones relativas de los restos de hexosa y ácido siálico, y en los cuales se basa su clasificación (Tabla 2); casi todos los gangliósidos conocidos poseen un resto de glucosa unido a una ceramida mediante enlaces glucosídicos, se encuentran también restos de D-galactosa y GalNAc, [44, 58].

| | | | | | | | | |
|----|-----|---|-----|---|-----|---|----------|------|
| 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM1 |
| 2 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM2 |
| 3 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM3 |
| 4 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM4 |
| 5 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM5 |
| 6 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM6 |
| 7 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM7 |
| 8 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM8 |
| 9 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM9 |
| 10 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM10 |
| 11 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM11 |
| 12 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM12 |
| 13 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM13 |
| 14 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM14 |
| 15 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM15 |
| 16 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM16 |
| 17 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM17 |
| 18 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM18 |
| 19 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM19 |
| 20 | Gal | 1 | Gal | 1 | Gal | 1 | Ceramide | GM20 |

Tabla 2. Estructura de algunos Gangliósidos.

Nota: El numeral del subíndice es 5n, donde n es el número de restos de azúcar neutros.

1.3 FUNCIÓN DE LOS GLUCOESFINGOLÍPIDOS.

Actualmente se ha prestado atención a la bioquímica de los esfingolípidos. Aunque son constituyentes menores de las membranas, revisten gran importancia en cierto número de funciones especializadas [16].

La esfingosina se forma en el cerebro a partir del ácido palmítico y puede ser acilada para formar ceramida. Entonces puede formarse: cerebrosídeos, -glucoesfingolípidos y gangliósidos por agregado de algún hidrato de carbono. - En el cerebro adulto el 90% de los cerebrosídeos se encuentran en la mielina, -mientras que los gangliósidos predominan en las neuronas, también se encuentran en las membranas de las células gliales y por ser abundantes en extremidades -nerviosas, es posible que actúen en la transmisión de impulsos nerviosos a través de la sinapsis. Se encuentran presentes en centros receptores de acetil--colina y otras sustancias neurotransmisoras [58].

La síntesis de cerebrosídeos y sulfátidos es más activa durante la mielinización del sistema nervioso en desarrollo. La concentración total de gangliósidos en el cerebro se duplica entre el momento del nacimiento y la madurez, también varían considerablemente las concentraciones de gangliósidos específicos [87].

Algunos glucoesfingolípidos de la superficie celular se hallan relacionados no solamente con la especificidad del grupo sanguíneo, pues las proteínas de dichos grupos contienen cadenas laterales oligosacáridas con restos de L-fructosa, D-glucosa, GalNAC y también con la de órganos y tejidos. Las células cancerosas, por ejemplo, poseen glucoesfingolípidos característicos que son diferentes de los de las células normales. Debido a esto existen diferentes enfermedades provocadas por carencias enzimáticas, que provocan la acumulación de diferentes esfingolípidos [16, 58, 87].

1.4 RELACION ENTRE ALTERACION LISOSOMAL Y DEGRADACION DE ESFINGOLIPIDOS.

Existen deficiencias hereditarias en enzimas de degradación localizadas en los lisosomas, de manera que se acumulan lípidos en concentraciones anormales en el interior de las células, principalmente neuronas [16].

La característica principal de todas las enfermedades por almacenamiento de lípidos consiste en la disminución o ausencia total de una enzima hidrolítica específica necesaria para el catabolismo de un lípido que aparece durante el proceso normal de reposición de células y tejidos. Se sabe que el grado de déficit enzimático es parecido en todos los órganos y células del paciente; pues dichas células al cultivarse in vitro presentan un déficit enzimático proporcional al de los órganos y tejidos del paciente del que se obtuvieron las células. Por lo tanto, la detección de alteraciones enzimáticas específicas de las esfingolipidosis es absolutamente necesaria para su tratamiento [98].

1.5 SISTEMA NERVIOSO.

El Sistema Nervioso posee millones de neuronas colocadas unas con otras en forma sumamente compleja, pero ordenada. La neurona manda el mensaje, iniciado y propagado por fenómenos fisicoquímicos, bajo forma de un impulso eléctrico que recorre la fibra eferente (cilindroeje). La neurona misma recibe im pulsos o mensajes de otras neuronas mediante prolongaciones cortas (dendritas), que establecen contacto con los cilindroejes de otras neuronas. Evidentemente, puesto que los mensajes se transmiten bajo forma de impulsos eléctricos a las

fibras de conducción o cilindroejes, estos deben estar aislados unos de otros. Este aislamiento se consigue con una sustancia grasosa blanca (mielina) que rodea cada fibra. Ciertas partes del Sistema Nervioso Central y casi todos los nervios periféricos están formados principalmente por fibras mielinizadas, y esta gran cantidad de mielina comunica a dichas regiones y estructuras un color blanco (materia blanca). Algunos nervios, por ejemplo, las fibras del sim pático y parasimpático, carecen de mielina. Las regiones del sistema nervioso donde se encuentra un gran número de neuronas tiene un color grisáceo (materia gris); es el caso de la corteza cerebral y de algunos núcleos, por ejemplo, - los basales [62, 87].

1.6 ESTRUCTURA DE SOSTEN DEL SISTEMA NERVIOSO.

Las células nerviosas (neuronas), sus dendritas y sus cilindroejes mielinizados, son soportados por varias células y estructuras. En todo del sistema nervioso, existe una armazón nutritiva formada por vasos capilares finos, cubiertos por prolongaciones muy finas de las leptomeninges, existiendo un espacio microscópico (espacio de Virchow-Robin) alrededor de estos pequeños vasos - [62].

Alrededor de esta armazón, algunas células especiales, denominadas astrocitos, forman una red muy compleja que sostiene las neuronas y las fija a los vasos sanguíneos. Existen dos tipos de astrocitos: los astrocitos protoplasmáticos, que tienen ramificaciones numerosas que se introducen entre las neuronas, y están unidos a los vasos capilares por "pies perivasculares" terminales. Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran casi exclusivamente en la materia gris. Por otro lado, se encuentran en la materia blanca astrocitos fibrinosos o fibrilares, cuyas prolongaciones se intercalan entre las fibras mielinizadas hasta establecer contacto con los capilares. Las prolongaciones de los astrocitos fibrilares difieren de los de la variedad protoplasmática en que - son más largas, presentan menos ramificaciones y contienen fibrillas finas [62].

La oligodendrogía está formada por células mucho más pequeñas, con las - prolongaciones más cortas y menos numerosas que en el caso de los astrocitos. Este tejido se encuentra tanto en la materia gris como en la blanca. En esta última, suelen presentarse como hileras entre las fibras mielinizadas a lo - largo de los capilares. En la materia gris, la oligodendrogía con frecuencia

rodea a las neuronas, y los capilares, y sus células se denominan "satélites perineuronales" [62].

Las células de microglía son pequeñas células fagocíticas con núcleos - irregulares. Probablemente provienen de la piamadre que rodea a los capilares y la corteza cerebral. En conjunto, los tres tipos de "células de sostén": as trocitos, oligodendrocitos y microgliocitos, se denominan "neuroglía"; pero - acabamos de ver que la microglía difiere del resto del tejido por su origen me senquimatoso. Al igual que otras estructuras nerviosas con excepción de las me ninges, los vasos sanguíneos y la microglía, los astrocitos y oligodendrocitos tienen origen ectodérmico. En la materia gris la microglía tiende a formar sa télites perinucleares, aunque estas células no sean tan numerosas como las de oligodendroglía. Las células de microglía son las células de "limpia" o "ma-- crófagos" del sistema nervioso. Cuando el tejido nervioso lesionado se dege ra, las células de microglía aumentan de número y tamaño en la zona correspon-- diente, y su citoplasma se hincha y aclara; en esta etapa se denominan "célu-- las de fagocitosis" o "corpúsculos granulados compuestos" [62].

2. ENFERMEDADES LISOSOMICAS POR DEPOSITO DE ESFINGOLIPIDOS

2.1 ENFERMEDAD DE GAUCHER.

2.1.1 HISTORIA.

La enfermedad de Gaucher fue la primera esfingolipidosis identificada como entidad clínica específica, y en la cual la química del lípido - acumulado fue correctamente identificada. El proceso de la enfermedad fue descrito por Phillippe C.E. Gaucher, quien lo consideró un epiteloma esplénico que provocaba la aparición de signos en otros tejidos: un bazo con grandes células pálidas que reemplazaban la pulpa esplénica, [7].

Bovaird (1900) encontró células similares en el hígado, bazo y nódulos linfáticos, pero no la consideró como un problema neoplásico. Brill, Menlebaum y Libman (1905), reconocieron la casi constante afectación del sistema óseo y sugtituyeron el término erróneo de "esplenomegalia idiopática primaria", por el de "enfermedad de Gaucher" (1913). Marchard (1907), atribuyó las células agrandadas y pálidas a una sustancia extraña, más tarde identificada por Epstein (1924) y Lieb (1929), como cerasina (un galactocerebrósido). También Halliday, Devel. Tragerman y Ward (1940) encontraron que los cerebrósidos celulares pueden ser glucocerebrósidos, hecho que confirmaron posteriormente otros investigadores. - Oberling y Woringer (1927), señalaron que en los niños la enfermedad de Gaucher afecta a casi todos los órganos y suele ser fatal. A partir de los estudios realizados sobre etiología y patogenia de la enfermedad se establecieron diversos conceptos de gran importancia que se han aplicado a las demás enfermedades por depósito de lípidos [16, 97].

2.1.2 DEFINICION.

La enfermedad de Gaucher (E.G.), es un desorden familiar - relativamente común, caracterizada por la acumulación anormal de glucocerebrósidos en células reticuloendoteliales, debido a una deficiencia específica en la actividad de la glucoceramida-beta-glucosidasa también denominada: glucocerebrosidasa, una hidrolasa ácida que se encuentra en los lisosomas [97].

La enfermedad de Gaucher ha sido dividida en 3 formas clínicas:

- Tipo 1 : Forma Crónica neuropática o Forma Adulta
- Tipo 2 : Forma Aguda neuropática o Forma Infantil
- Tipo 3 : Forma Subaguda neuropática o Forma Juvenil [16, 97].

2.1.3 PATOFISIOLOGIA.

Origen de los glucocerebrósidos acumulados.

Los cerebrósidos son compuestos que contienen cantidades equimolares de - esfingosina, ácido graso y hexosa. En el cerebro la hexosa componente es una galactosa, y los galactocerebrósidos forman una parte esencial de la mielina - en la materia blanca. En tejidos ajenos al cerebro, exceptuando al riñón, - prácticamente todas las pequeñas cantidades de cerebrósidos presentes contienen sólo glucosa. Estos glucocerebrósidos surgen principalmente de la degradación de esfingolípidos más complejos; una fuente importante surge de la destrucción normal de leucocitos y eritrocitos. Los glucocerebrósidos constituyen entre - 0.1 y 0.2% del peso seco del bazo normal; en la E.G., esta proporción puede alcanzar hasta 4% [4, 16, 97].

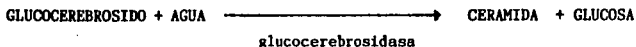
Se postularon algunas hipótesis para descubrir la etiología de la E.G.; - estas hipótesis atribuyen la enfermedad a:

- Alteración del metabolismo de los hidratos de carbono.
- Exceso de producción de glucocerebrósidos en los tejidos.
- Déficit de la enzima necesaria para la degradación de los glucocerebrósidos.

Pick (1933), supone que existe una perturbación general del metabolismo - intermediario lipídico que afecta a los cerebrósidos, a consecuencia de lo cual se acumulan en el suero, originando infiltración y depósito secundario en las células del retículo de órganos viscerales. Esta hipótesis no está de acuerdo con las condiciones reales. En el suero de los pacientes con E.G. y en el - suero normal, sólo hay indicios de cerebrósidos y los eritrocitos no contienen más cerebrósidos que los de las personas normales [16].

Los estudios de Thannhauser; Trams y Brady, demostraron la inexactitud de las dos primeras hipótesis. La alteración metabólica fue detectada por la siguiente serie de experimentos:

Primero se sintetizaron glucocerebrósidos con radiocarbono C_{14} en la fracción D-glucosa de la molécula [14], utilizando este material marcado como sustrato y demostrándose en todos los tejidos del organismo una enzima que cataliza la hidrólisis de los glucocerebrósidos según la reacción:



La actividad específica máxima de esta enzima se encuentra en tejidos esplénicos. El nivel medio de actividad de la enzima en muestras procedentes de pacientes con la enfermedad Adulta de la E.G. era de sólo 15% de la actividad observada en los controles. Debe señalarse que en pacientes adultos existe siempre actividad de glucocerebrosidasa aunque esta se encuentra disminuida. En las muestras de tejido esplénico de pacientes con la forma Infantil de la enfermedad, la actividad glucocerebrosidasa es prácticamente nula [14].

La rapidez de progresión de los signos y síntomas de la E.G. se halla en proporción inversa a los niveles de actividad glucocerebrosidasa. Los pacientes con mayor actividad enzimática muestran menor desarrollo de hepatoesplenomegalia y afectación de médula ósea [16].

Los glucocerebrósidos que se acumulan en las células reticuloendoteliales del bazo, hígado y médula ósea, proceden de los catabolitos lipídicos de las membranas de leucocitos y eritrocitos viejos. Los eritrocitos normalmente contienen glucocerebrósidos y esfingoglucolípidos neutrales tales como:

- Ceramida lactósido : Cer-Glu-Gal
- Ceramida trihexósido: Cer-Glu-Gal-Gal
- Globósido : Cer-Glu-Gal-Gal-Gal(NAc)

Algunos gangliósidos o compuestos conteniendo: Acido-N-acetilneuramínico (NANA), son también originarios adicionales de glucocerebrósidos en eritrocitos. Estos incluyen:

- Hematósido : Cer-Glu-Gal-NANA
- Gangliósido: Cer-Glu-Gal-N-acetilglucosamina-Gal-NANA

Las fuentes ya citadas no originan la totalidad de la acumulación de glucocerebrósidos en las neuronas de los individuos con la forma Infantil de la E.G; sino que en estos pacientes, los glucocerebrósidos proceden en gran parte

de los gangliósidos:

Monosialogangliósido (GM₃): Cer-Glu-Gal-N-acetilgalactosamina-Gal

NANA

que son componentes normales de las células nerviosas. Estos gangliósidos sufren una rápida reposición metabólica durante el período neonatal y disminuyen su ritmo de reposición con el tiempo. Los glucocerebrósidos se acumulan en las neuronas de los afectados de la forma Infantil como resultado de un bloqueo de la penúltima reacción del catabolismo de gangliósidos [73].

Por otro lado, se tiene que el lactósido de ceramida es el mayor glucolípidido neutral de los leucocitos y se ha estimado que la mayoría de los glucocerebrósidos surgen de la renovación de éstos [112].

Los glucocerebrósidos también pueden surgir de la renovación de plaquetas (estos elementos contienen los 4 oligosacáridos ceramida neutrales encontrados en los eritrocitos, además del hematósido), así como de la renovación normal de algún tejido del cuerpo [15]. Planteándose la posibilidad de reutilización de la porción glucocerebrósido de estas moléculas para la síntesis de homólogos superiores [2] que complica cualquier esfuerzo para estimular la cantidad de glucocerebrósidos derivados de estos tejidos [97].

Renovación de Glucolípidos.

Tres aspectos de renovación de glucolípidos en sangre y órganos tiene particular importancia para la patogénesis de la E.G.:

- El primero, es que sólo una pequeña fracción de glucocerebrósidos catabolizados cada día se acumula en los principales órganos afectados.

- El segundo aspecto es concerniente a la causa del agrandamiento del hígado en pacientes E.G., pues el grado de agrandamiento puede ser de hasta 1 Kg. La hepatoesplenomegalia es en parte un intento compensatorio por parte de estos órganos para proveer enzima adicional.

- El tercer punto se refiere al origen de glucocerebrósidos en el cerebro de pacientes Tipo 2 y 3, pues éstos surgen del catabolismo de tetrahexosil gangliósidos tales como: GM₁ (Cer-Glu-Gal(NANA)-Gal; y son el principal origen de glucocerebrósidos en sistema nervioso. La principal localización de las células de Gaucher en el cerebro está en los sitios yuxtavasculares, y el origen de la célula de Gaucher perivascular en la enfermedad Tipo 2 es el resultado de la acumulación local de glucocerebrósidos transportados dentro de eritro

citos o plasma. En pacientes con enfermedad Tipo 2 y 3, la solubilidad de glucocerebrósidos en áreas perivasculares del cerebro puede ser superada, provocando pinocitosis y resultando la formación de una célula de Gaucher en estas áreas [97].

Célula de Gaucher.

La morfología distintiva de la E.G., es la célula de Gaucher, que es redonda (Fig. 5) o poliédrica (Fig. 6), con retículo pálido, diámetro de 20 a 80 micras; contiene un pequeño núcleo excéntrico y citoplasma espumoso, donde se encuentra una red irregular de fibrillas. Estas células son capaces de fagocitar eritrocitos; así como células polimorfonucleares (PMN) y plaquetas [83].

Con microscopio electrónico, las fibrillas se caracterizan por representar túbulos o filamentos de glucocerebrósidos contenidos dentro de lisosomas secundarios teniendo una sola membrana limitando y consisten en estructuras tubulares cuyas medidas son: 200-600 Å de diámetro. Cada estructura tubular está compuesta por un paquete de 10 a 12 fibrillas de 30 Å de espesor cada una, poco a poco enrolladas en espiral a lo largo de un "eje", con una periodicidad de 1,700 Å aprox. [70].



Fig. 5. Célula de Gaucher redonda con apariencia de esponja.



Fig. 6. Célula de Gaucher poligonal con microvellosidades.

Para confirmar el desarrollo de estructuras tubulares en los lisosomas digestivos de células sanguíneas fagocitadas dentro de macrófagos, monocitos - sanguíneos obtenidos de pacientes Gaucher y dos controles sanos fueron cultivados en un medio conteniendo eritrocitos desnaturalizados por calor. Una hora después de la incubación, los monocitos de los pacientes mostraron fuerte eritrofagocitosis y se describieron eritrocitos ingeridos en varios estados de digestión y degradación. Uno o dos días después de cultivarlos, los monocitos provenientes de pacientes se transformaron y desarrollaron una pequeña cantidad de estructuras tubulares, y capas diminutas en espesor de muchas vacuolas fagocíticas. En contraste, los monocitos cultivados de controles normales no produjeron alguna estructura tubular. Estos hechos indican claramente que la fagocitosis de eritrocitos es un importante mecanismo para desarrollar la - célula de Gaucher [83].

Por otro lado, se plantea la fagocitosis de estructuras extracelulares por células de Gaucher; al existir ruptura de la membrana celular, algunas estructuras tubulares fueron encontradas fuera de las inclusiones, mitocondrias diseminadas y otros organelos; estructuras tubulares mezcladas con fragmentos celulares o sustancias necróticas. Tales estructuras estaban ocasionalmente enrolladas con algunas microvellosidades de las células de Gaucher y ocupadas por ellas dentro de las vacuolas fagocíticas, aumentando las mitocondrias y la dilatación del RER en células de Gaucher densamente cargadas, indicando cambios de degeneración. Para confirmar este proceso fagocítico, fueron cultivados monocitos adicionando en el medio estructuras tubulares. Desde 6 horas hasta 2 días después de la incubación, varias cantidades de estas estructuras fueron encontradas por estar ingeridas dentro de fagolisosomas de monocitos provenientes de pacientes y controles normales. En algunas inclusiones, las estructuras tubulares escaparon de la matriz citoplasmática por medio de rompimiento de la - membrana limitante. Dos días después del cultivo, los monocitos fueron transformados de macrófagos hasta células de Gaucher por un gran desarrollo de vacuolas fagocíticas cargadas con numerosos túbulos. Después de 3 días de cultivo, casi todas las células de Gaucher están degeneradas y muchas zonas blancas aparecen en las células, no obstante, un número pequeño de células de Gaucher - fueron observadas ingiriendo activamente estructuras tubulares liberadas por - células de Gaucher destruídas. Después de 5 días de cultivo, casi todas las - células de Gaucher desaparecieron [70, 83].

A partir de estos descubrimientos, se concluye que la ingestión (realizada

por macrófagos) de estructuras tubulares extracelulares liberadas de células de Gaucher, probablemente por excitosis o destrucción celular, es otro mecanismo para el desarrollo de las células de Gaucher. Este mecanismo es mucho más evidente en los estados clínicos tardíos de la E.G., cuando una gran cantidad de cerebrósidos está presente en el bazo y otros órganos [70, 83].

La evidencia de la activa fagocitosis o pinocitosis se localiza en el borde de la célula, y fragmentos de eritrocitos son visibles frecuentemente (Fig. 7). En algunas células puede haber dos o más núcleos. Las numerosas fibrillas ondulantes son teñidas intensamente con Acido de Schiff o con Tricromo de Mallory que colorea tejido conectivo [4].

Al ser las células de Gaucher macrófagos transformados, existe en consecuencia una estrecha relación con otras células del sistema fagocítico mononuclear.

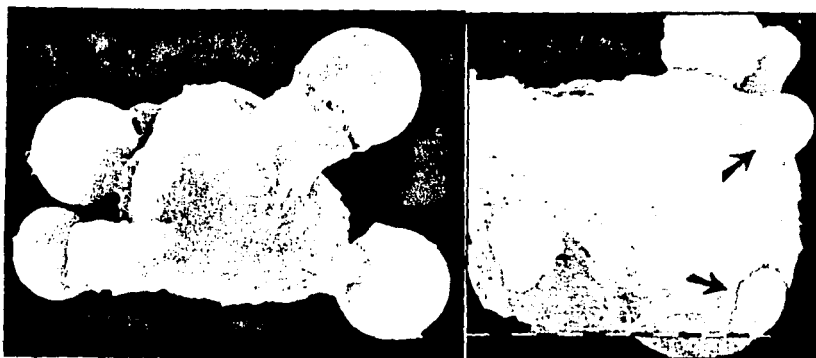


Fig. 7. Célula de Gaucher atacando a eritrocitos de carnero con proyecciones de pseudópodos y rugosidades (Fagocitosis).

Los monocitos examinados por microscopía electrónica, muestran membranas rugosas y contornos como colinas, lo cual permite a los investigadores distinguir entre éstas y otras células mononucleares. La superficie de los macrófagos se caracteriza por la presencia de varias salientes y colinas; la forma de las células varía de acuerdo a las condiciones de estimulación. Mientras que el tamaño de las células de Gaucher es mucho más grande que el de monocitos y

macrófagos. La apariencia de proyecciones como vellosidades en algunas células puede reflejar la posición funcional de la célula. La célula de Gaucher en el proceso de fagocitosis todavía posee una superficie irregular, mientras que después de la terminación de la fagocitosis, la membrana llega a encubrirse y los cambios experimentados son similares a aquellos observados en macrófagos (pérdida de colinas normales adquiriendo la característica de la superficie de las células llenas), [29, 88].

Efecto selectivo de los Glucocerebrósidos.

Estudios con macrófagos cultivados sugieren que las células de Gaucher están involucradas en los procesos patológicos que inducen daño o muerte a células vecinas en diferentes tejidos, o por liberación de factores humorales derivados de macrófagos o porque estas células dañan la actividad fagocítica [37].

Experimentalmente se han producido in vitro células de Gaucher, mediante el empleo de un compuesto denominado: conduritol-epóxido (CBE), que es un inhibidor específico irreversible de la enzima lisosomal beta-glucosidasa en macrófagos peritoneales de ratón ha sido previamente estudiado [88]. El empleo de CBE ha facilitado la obtención de células de Gaucher para poder realizar estudios tanto estructurales como de producción y liberación de sustancias [37, 72].

Muy poco es sabido acerca de los efectos de la glucosilceramida (GL_1) sobre los macrófagos: recientemente se han realizado varios experimentos para examinar dichos efectos. Los parámetros de prueba han incluido la liberación de enzimas lisosomales (hexosaminidasas) y citoplasmáticas (LDH: Lactato-deshidrogenasa que es un indicativo de daño celular); así como de una monocina que es un factor activador de linfocito (LAF), también designado Interleucina 1 (IL-1). Asumiéndose que la secreción incrementada de LAF y enzimas lisosomales es debido al menos en parte a daño celular [1, 25, 115].

El plasma de pacientes Gaucher contiene aprox. 10-15 microgramos de GL_1 /ml; este mismo rango produce toxicidad en los cultivos, y se sabe que las células de Gaucher pueden contener algunos cientos de microgramos de GL_1 . Biopsias de hígado y médula ósea provenientes de pacientes, frecuentemente muestran evidencias de daño celular [25].

También se encuentra que GL_1 sinergizado con LPS induce la secreción de excesivas cantidades de LAF por macrófagos humanos. La estimulación combinada proporciona, por lo tanto, un nuevo método para obtener elevados niveles de LAF [93].

La selectividad de GL_1 por macrófagos puede derivarse de la capacidad de estas células para enlazarse o absorber GL_1 , aunque el mecanismo no es conocido, se sabe que la glucosa presenta afinidad por el receptor manosa del macrófago. La posibilidad de que éste u otro receptor este involucrado en enlaces o captación de glucolípidos está bajo investigación [96].

Teniendo que el aumento en la liberación de productos por macrófagos GL_1 afectados puede participar en causar daño a hígado y médula ósea, incrementando niveles de enzimas lisosomales [37, 69].

Por otro lado, se describe una asociación entre la enfermedad de Gaucher Tipo 1 y concentraciones reducidas en plasma total de lipoproteína de baja densidad (LDL) y Lipoproteína de alta densidad (HDL), sugiriéndose que el acúmulo de GL_1 en macrófagos puede estar asociado con anomalías significativas en el metabolismo de lipoproteínas [25].

También se tiene que las reducciones de colesterol en plasma están relacionadas inversamente en cuanto a la severidad clínica de la enfermedad. Pues los niveles en plasma de Apolipoproteína B (Apo-B), la mayor proteína estructural dentro de LDL y la Apolipoproteína A-I (Apo-I), el mayor componente de la HDL están también reducidos. En general, la hipocolesterolemia previamente de mostrada en un grupo de pacientes con E.G., proviene del incremento del catabolismo de ambas LDL y HDL [13].

Los resultados de estudios efectuados con 99-m-technetium (en el cual hay incremento en la acumulación de LDL en bazo y médula ósea de pacientes Gaucher) indican un incremento en la liberación de colesterol a partir de LDL por macrófagos; cuando éstos son recubiertos por cargas incrementadas de colesterol (libre o esterificado) parece responder por síntesis y secretando Apo-E [38].

La Apo-E es un importante constituyente de las lipoproteínas del plasma en humanos y animales, está enlazada con alta afinidad hacia receptores sobre la superficie de células del hígado y extrahepáticas. Como resultado, algunas de las lipoproteínas que contienen Apo-E son rápidamente recogidas por el hígado (por medio de un proceso de endocitosis mediado por un receptor) y la Apo-E emerge desde el hígado enlazada a fosfolípidos en forma de discos laminares. En adición a la Apo-E, éstos discos contienen Apo-A y son dirigidos hacia partículas HDL nacientes. Dentro de la circulación de Apo-E contenida en discos se cree que son convertidos en estructuras esféricas pseudomicelares cuando la lipoproteína es agrandada por inserción de ésteres de colesterol, los cuales son sintetizados en el plasma por la acción de LCAT (Lecitin-colesterol-acil

transferasa). Proponiéndose que la Apo-E nuevamente secretada en combinación con los fosfolípidos y membranas celulares libres de colesterol y posiblemente con pequeñas partículas de HDL, forman HDL-Apo-E enriquecida [3].

Un modelo hipotético (Fig. 8) se propone para explicar que el colesterol secretado surge a partir de la célula hepática. La Apo-E derivada de macrófago sobre discos de fosfolípidos sirve para algunos propósitos:

- Abastecer de fosfolípidos que sirven como donadores de ácido graso para la esterificación del colesterol secretado por medio de LCAT.
- Algunos de los fosfolípidos de los discos de Apo-E pueden transferirse hacia HDL para permitir la expansión de su superficie de manera que la partícula de HDL puede ordenar los ésteres de colesterol incrementados.
- La Apo-E puede transferirse hacia la partícula de HDL. La adición de Apo-E y de ésteres de colesterol convierte la partícula de HDL en HDLc, que es un lipoproteína rica en colesteril-éster; la cual es absorbida por el hígado que convierte el colesterol a ácidos biliares o lo excreta como colesterol biliar. Este paso final en el proceso produce bajos niveles de HDL en el plasma, a la vez que protege al macrófago de una sobrecarga de colesterol [3, 55].

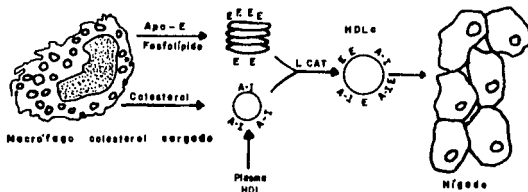


Fig. 8. Papel de la secreción de Apo-E.

La explicación con bases moleculares en las manifestaciones neurológicas (enfermedad Tipo 2 y 3) en cuanto a concentración y composición de colesterol, glucosfingolípidos neutros y gangliósidos se han examinado en cortes de cerebro y cerebelo en algunos casos Tipo 2 y 3. El descubrimiento de glucosfingosina en el cerebro es de gran importancia, pues una acumulación de esta sustancia en las neuronas de la E.G. puede conducir a su muerte y destrucción por neurofagia. Los exámenes neuropatológicos de cerebro Tipo 2 muestran áreas con pronunciada pérdida de células nerviosas; presencia de neurofagia; células de Gaucher en distribución perivascular pero también libres en tejido cerebral. Los cambios están más marcados en los estratos: piramidal y ganglionar de la

corteza cerebral, el metencéfalo y las células de Purkinje en el cerebro [73].

En casos Tipo 3, existe un pronunciado almacén intraneuronal, con características de tumefacción neuronal. En ambos tipos (2 y 3), además de la glucosilesfingosina existe acumulación de glucosilceramida. Hay grandes diferencias entre la acumulación entre los diferentes Tipos de la E.G., pero también entre la corteza cerebelar y cerebelar del mismo tipo. En la corteza cerebral la concentración más grande se encuentra en los casos Tipo 2 (más fulminante); mientras que en la corteza cerebelar la más alta concentración de glucosilceramida ocurre en casos Tipo 3. Además se tiene que la glucosilesfingosina nunca se ha detectado en cerebro humano normal o cerebelo. La concentración de glucosilesfingosina es más alta en el Tipo 2; los resultados de lo anterior quedan indicados a continuación (ver Tabla 3), [10].

| CORTEZA CEREBRAL | | | | CORTEZA CEREBELAR | | | |
|----------------------------------|-----|--------------------------|---|----------------------------------|------|--------------------------|---|
| TIPO: E.G. | | micromol/kg (p.h.) | | TIPO: E.G. | | micromol/kg (p.h.) | |
| CONTROLES: GLUCOSIL- CERAMIDA | | GLUCOSIL- ESFINGOSINA | | CONTROLES: GLUCOSIL- CERAMIDA | | GLUCOSILES- FINGOSINA | |
| 6-24 m. n=11: | 5 | - | - | 5-8 m. : | 10 | - | - |
| 5-20 a. n=9: | nd | - | - | 5-20 a. : | 16 | - | - |
| II:1 | 377 | 8.8 | | II:1 | 133 | 12.3 | |
| II:2 | 130 | 4.3 | | II:2 | 51 | 3.9 | |
| II:3 | 530 | 6.0 | | II:3 | 450 | 10.0 | |
| II:4 | 140 | 5.4 | | II:5 | 270 | 5.6 | |
| II:5 | 150 | 3.8 | | | | | |
| III:1 | 45 | 2.2 | | III:2 | 120 | 1.4 | |
| III:2 | 38 | 0.6 | | III:3 | 132 | 1.8 | |
| III:3 | 37 | 0.9 | | III:4 | 59 | 4.1 | |
| III:4 | 44 | 4.4 | | III:6 | 457 | 4.4 | |
| III:5 | 43 | 1.0 | | III:8 | 1750 | 6.3 | |
| III:6 | 65 | 0.8 | | III:13 | 305 | 6.1 | |
| III:8 | 60 | 1.0 | | | | | |
| III:13 | 42 | 4.6 | | | | | |

Tabla 3. Concentración de Glucosilceramida y Glucosilesfingosina en corteza cerebral y cerebelar de cerebros con E.G., y controles.

NOTA: m = meses; a = años; p.h. = peso húmedo.

Los resultados experimentales sugieren que después de la esplenectomía hay acumulación acelerada de glucosilceramida en las células adventicias de pequeños vasos sanguíneos en el cerebelo. Sin embargo, la glucosilceramida no es -

tóxica por si misma, un proceso de almacén dentro de células adventicias de los pequeños vasos sanguíneos puede (junto con la acumulación de glucosilesfingosina) ser de importancia para el desarrollo de los disturbios y función intelectual [10, 21].

Organos y Sistemas involucrados en la E.G.

- Bazo:

El hiperesplenismo ocurre en casi todos los pacientes Tipo 1 y 3, y es usualmente sin dolor. Trombocitopenia, epistaxis, púrpura, infartos hemorrágicos y otros episodios sanguinolentos pueden aparecer. El sangrado tiende a ser respuesta hacia la esplenectomia, con una elevación en el número de plaquetas [97, 98].

- Sistema Linfático:

Las células de Gaucher están frecuentemente presentes en nódulos linfáticos, timo, placas de Peyer en el intestino y tonsilas faríngeas en niños con E.G. Tipo 2 y 3.

- Hígado y Riñones:

Grupos de células pueden rodear la zona central del hígado. Hipertensión portal y hematemesis no son frecuentes, la ascitis es rara. Las pruebas de funcionamiento hepático son usualmente normales, aunque puede ocurrir disfunción en el hígado. La ictericia no es una característica de desorden primario. Las pruebas de funcionamiento renal son normales [98].

- Huesos:

El esqueleto involucrado es de pacientes con Tipo 1 y 3. La corteza del fémur está expandida, dando al hueso un contorno de frasco Erlenmeyer al examinar radiológicamente. Moderada o severa artralgia, seguida de compresión o fractura en la región de la articulación de la cadera. Involucrando otros huesos largos, falanges y costillas, aunque son menos frecuentes.

- Sistemas: Pulmonar y Cardiovascular:

Algunos niños con E.G. tienen tos productiva, dolor de pecho, neumonía recurrente y dolor respiratorio. Las células de Gaucher están presentes en los capilares alveolares y vasos linfáticos en el pulmón y pueden ser la base de la hipertensión pulmonar. A nivel cardíaco es principalmente la forma de una pericarditis constrictiva lo cual es usualmente doloroso.

- Sistema Nervioso:

Las células neuronales de la corteza calcárea, núcleos dentados, tallo cerebral y ganglios basales llegan a estar involucrados en un proceso destructivo y un grado moderado de astrocitosis secundaria se ha descrito. La mayoría de las neuronas aparecen arrugada; la neurofagia es prominente en las capas profundas de la corteza y en el núcleo de ganglios basales y tallo cerebral. El grado de desmielinización varía; puede ser moderadamente severo en ciertas áreas y no tan evidente en otras regiones [97].

2.1.4 SINTOMATOLOGIA CLINICA.

Todos los pacientes en cualquiera de los 3 Tipos de la E.G. presentan como consecuencia de la acumulación de glucoesfingolípidos en macrófagos del sistema fagocítico mononuclear la aparición de hepatoesplenomegalia, infiltración y reemplazo de la médula ósea por macrófagos glucoesfingolípidos-cargados, y las consecuencias hematológicas correspondientes a ambas alteraciones. Incluyendo nódulos linfáticos agrandados; lesiones óseas; presentándose "células de Gaucher" en médula ósea y casi siempre tienen un incremento en la actividad de la fosfatasa ácida en suero [97].

Tipo 1: Forma Crónica no neuropática o Adulta.

La ausencia de signos de complicación cerebral constituye la base para la clasificación en la E.G. Tipo 1; la razón de que éstos pacientes no desarrollen síntomas neurológicos se plantea como un sólo cambio en base a un gen que causa la enfermedad [53]. El término "Adulto" en la E.G. es frecuentemente empleado, aunque las manifestaciones viscerales aparecen en la niñez y el curso clínico puede no ser benigno. Presentándose alteraciones como hepatoesplenomegalia y la presencia de células de Gaucher en otros órganos: nódulos linfáticos, huesos y médula ósea; no estando implicados otros órganos y especialmente el sistema nervioso. Los pacientes no parecen enfermos y tienen mal aspecto solamente durante un ataque de dolor óseo agudo con fiebre [97].

Inicialmente los niños pueden no tener muchos problemas, pero conforme se aproximan a los 13-19 años de edad, el dolor de piernas, brazos y espalda pueden ser severos, y estar acompañado por fiebre; así como presentar algunas limitaciones en el crecimiento físico. Algunos de estos pacientes pueden tener distensión abdominal e hipotonicidad del intestino grueso, dificultades respi-

ratoria, involucrando a los pulmones, que pueden predisponer hasta una neumonía, la cual es la causa mayor de muerte en pacientes jóvenes. Algunos pacientes de edad madura tienen palidez amarilla y pigmentación café-amarilla difusa sobre la cara y piernas. La naturaleza química del pigmento es de melanina. - Los depósitos de hemosiderina que se encuentran regularmente en los órganos afectados por la E.G., no causan pigmentación cutánea; también se señala frecuente miopía [9, 97].

Existe un decremento de plaquetas en el flujo sanguíneo, conduciendo a fácil contusión y algunas veces hacia una peligrosa tendencia hemorrágica. Ligera anemia microcítica y leucopenia, son relativamente comunes. El hierro desaparece rápidamente del plasma en estos individuos, pues la captación de hierro por los eritrocitos es baja, ya que éste es apartado del plasma y almacenado dentro de las células de Gaucher [4].

Las glándulas endócrinas no se afectan en la Forma Adulta. No se encuentran células de Gaucher en la corriente sanguínea periférica, ni aumentan los cerebrosidos en el estroma de los eritrocitos. Se puede presentar trombocitopenia y en la fase tardía pancitopenia si la médula ósea va siendo reemplazada por numerosas células de Gaucher. En estos casos se ha observado metaplasia mielóide; sus manifestaciones tardías son las hemorragias petequiales. Las epistaxis y sangrías por las membranas mucosas puede conducir a una anemia terminal. La esplenectomía está indicada en los casos con trombocitopenia y leucopenia [4, 97].

Tipo 2: Forma Aguda neuropática o Infantil.

La forma aguda del lactante corresponde al grave déficit de la actividad enzimática (beta-glucosidasa) con un comienzo clínico a partir de los primeros meses de vida. Las anomalías del SNC son manifestadas primeramente por regresión de la función motora y espasticidad. El daño al sistema nervioso llega a aparecer entre el sexto y séptimo mes de vida, pero algunos pacientes pueden estar anormales al poco tiempo de haber nacido. Los signos neurológicos incluyen estrabismo, hipertonicidad muscular, retroflexión de la cabeza; pudiéndose presentar rigidez del cuello, trismus, disfagia, estridor laringeal, hiperreflexia; algunos tienen ataques, elevado nivel de fosfatasa ácida en suero y de células de Gaucher en aspirados de médula ósea. La característica patológica observada en el SNC, consiste en acumulaciones perivasculares de células de Gaucher, provenientes de la materia

blanca subcortical de la corteza cerebral y del cerebelo, tálamo y raramente - del tallo cerebral [21, 49]. Por otro lado, también se presenta un abdomen pro tuberante y hepatoesplenomegalia. Las principales causas de muerte son: anoxia e infecciones pulmonares [41, 47].

Tipo 3: Forma Subaguda neuropática o Juvenil.

Existe combinación de la forma Crónica con la lenta disfunción neurológica progresiva. Los pacientes - presentan hepatoesplenomegalia, lesiones y otras fallas de tipo Crónico que - aparecen en la infancia o después. El desarrollo psicomotor es frecuentemente normal durante el primer año de vida, pero entre la edad de 5 años y la adolescencia aparecen los síntomas neurológicos. Existe retraso mental, problemas - de conducta, ataques, trismus, dificultad en la coordinación de movimientos, - estrabismo en intervalos variantes. Se ha demostrado deficiencia de glucocerebrosidasa; otros glicolípidos pueden estar almacenados en bazo e hígado. Esta forma de enfermedad ha sido observada en adultos jóvenes, y en pacientes de - edad avanzada, cuyas edades eran 41 y 50 años; quienes mostraron retraso mental, ataques, temblores y problemas para caminar [42].

Aunque generalmente todo lo descrito anteriormente aparece más rápido en pacientes esplenectomizados, que en los que no lo están. Sin embargo, el Tipo 3 no siempre es clínicamente claro para distinguirlo del Tipo 1. Por lo que - deben crearse parámetros bioquímicos capaces de diferenciar ambos tipos [4, 53, 97].

2.1.5 INCIDENCIA.

La enfermedad afecta ambos sexos en forma igual y se encuentra distribuida en todo el mundo. Se han reportado casos en Caucasianus; Negros y Orientales; pero una alta proporción de casos ocurre entre los judíos de origen Ashenazic, donde la frecuencia es 30 veces más que en las otras razas.- En el Tipo 1 o Adulto, las manifestaciones clínicas pueden aparecer a cualquier edad, el diagnóstico se ha hecho en los primeros meses de vida y aún después de los 80 años. La incidencia de este proceso ha sido estudiada en judíos, en los que oscila entre 1/10,000 y 1/30,000 nacimientos. La enfermedad es compatible con una vida relativamente normal [97].

Pacientes con el Tipo 2 (Infantil) y 3 (juvenil), son menos comunes. El Tipo 2, aunque raro, es más prevalente en niños de descendencia no Jewis [66].

2.1.6 PRONOSTICO.

En los 3 tipos de la E.G., las manifestaciones clínicas - aparecen en la Infancia, pero los Tipos 2 y 3 progresan más rápido que el Tipo 1. En este último no se ha determinado el promedio de vida de los pacientes, pues lo único que se ha visto es que mientras no existan complicaciones el período de vida puede ser grande, sin embargo, se debe recordar que el curso de la enfermedad es extremadamente variable y tiende a ser más severo en niños - afectados, los cuales, en algunas ocasiones pueden presentar algunas alteraciones óseas cuando llegan a la adolescencia o como adultos jóvenes. En el Tipo 2, la enfermedad es evidente a partir de los 3 meses de edad. Los niños usualmente mueren dentro de los dos primeros años de vida. En el Tipo 3, aparecen más rápidamente las manifestaciones clínicas en pacientes esplenectomizados que en los que no lo están; esto va a influir para determinar el tiempo de vida, - [3, 73, 98].

2.1.7 DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de la E.G., es bastante directo. Puede hacerse en base a la hepatoesplenomegalia y la presencia de "células de Gaucher" en aspirados de médula ósea, o en biopsias de bazo e hígado; considerándose el desarrollo mental interrumpido. Así como, la realización de un diagnóstico diferencial cuando el paciente presente fractura patológica o tendencias hemorrágicas, trombocitopenia, leucopenia y monocitosis (en algunos casos), anemia en especial en niños [62].

Una ayuda diagnóstica de gran utilidad es el aumento de la fosfatasa ácida en suero, con cifras de 2 a 6 veces mayores a las normales, faltando la inhibición por tartrato y observándose una inhibición ligera con formaldehído. En ocasiones se presenta ligeramente aumentada la reacción indirecta de la bilirrubina. Los niveles de calcio y fosfato son normales. Los lípidos plasmáticos, generalmente bajos (disminución de las HDL), no suelen constituir un dato específico y no ayudan al diagnóstico [11].

Un procedimiento directo para la comprobación del diagnóstico es el ensayo cuantitativo de glucocerebrósidos en tejido (bazo o hígado). Los glucocerebrósidos son extraídos de tejidos por homogenización en una solución cloroformo--metanol 2:1; el extracto es saponificado con NaOH metanólico, y los glicolípidos neutros son separados por cromatografía en capa fina [11, 62].

El diagnóstico más simple es por medida de la actividad glucocerebrósida-

sa en una preparación de leucocitos lavados, obtenidos de una pequeña muestra de sangre venosa. El glucocerebrósido marcado con 4-metilumbelliferil-beta-D-glucopiranósido (Fig. 9), el sustrato más seguro para medir los niveles de beta-glucosidasa en leucocitos, este sustrato artificial tiene la ventaja de simplificar, pero es menos confiable que la de sustratos naturales. La razón para la discrepancia es que existe más de una ácido-beta-glucosidasa en los tejidos [47].

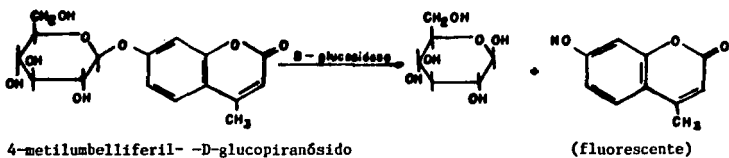


Fig. 9. Reacción de fluorescencia utilizada en el diagnóstico de la enfermedad de Gaucher.

Otro interesante fenómeno es que la hidrólisis del glicolípido natural es siempre más alta que la observada con glucósidos cromogénicos o fluorogénicos [62].

Los pacientes Gaucher pueden ser diagnosticados con mayor exactitud por medición de la actividad beta-glucocerebrosidasa en los gránulos subcelulares. Es necesario que los gránulos de la célula se conserven en refrigeración después de la recolección y conducirlos al laboratorio para el ensayo [97].

Los extractos de fibroblastos cultivados de piel son útiles como material de diagnóstico. [^{14}C]-glucocerebrósido, es el sustrato de elección para el ensayo de la actividad glucocerebrosidasa en las preparaciones. Los fibroblastos cultivados son particularmente útiles, debido a que ellos contienen una elevada actividad glucocerebrosidasa y la enzima en estas células es estable en congelación. Finalmente, un útil sustrato cromogénico ha sido sintetizado recientemente en el laboratorio; es el beta-glucósido derivado del 2-hexadecilamino-4-nitrofenol; este sustrato ha mostrado ser útil en el diagnóstico de la enfermedad con extractos de fibroblastos de piel, aunque se prefieren sustratos naturales [97].

2.2 ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK.

2.2.1 HISTORIA.

En 1914, A. Niemann, un pediatra alemán, describió por primera vez una afectación en un niño de 17 meses que resultaba semejante a la enfermedad de Gaucher Infantil, pero presentando distribución difusa de grandes células espumosas y pálidas en todos los órganos. Pick (1927), diferenció esta enfermedad clínica e histológicamente, de la E.G. Infantil. Boom y Kern (1927), encontraron un aumento en los fosfolípidos de ciertos órganos viscerales de la enfermedad de Niemann-Pick. Klenk (1934) demostró, sin embargo, que el aumento de fosfolípidos en los órganos de un niño era debido principalmente a la acumulación de un diaminofosfátido, concretamente: esfingomielina. La enfermedad de Niemann-Pick era considerada como una afección infantil fatal, ya que todos los casos reportados murieron en el segundo año de vida. Dusendschan y Favarger (1945), describieron dos casos de enfermedad en hermanos de 29 y 30 años, cuyo diagnóstico se comprobó en la autopsia [97].

2.2.2 DEFINICION.

Esta lipodistrofia se caracteriza por la acumulación de un fosfoesfingolípido (esfingomielina) en todo el organismo; debido a la deficiencia de esfingomielinasa, una enzima que hidroliza la esfingomielina para obtener ceramida y fosforilcolina. La enfermedad ha sido dividida en 5 categorías clínicas basadas en la rapidez de progresión del proceso y en el grado de afectación del SNC:

- Tipo A: Forma Aguda neuropática
- Tipo B: Forma Crónica sin involucrar el sistema nervioso
- Tipo C: Forma Crónica neuropática
- Tipo D: Forma variante Nueva Escocia
- Tipo D: Forma Adulta no neuropática [97].

2.2.3 PATOFISIOLOGIA.

Origen de la esfingomielina acumulada.

La esfingomielina es un lípido común constituyente de la membrana plasmática

tica, organelos subcelulares como: retículo endoplásmico y mitocondrias de células mamíferas. Es también el lípido mayor de la vaina de mielina y del estroma de los eritrocitos; ya que después de la lecitina y fosfatidiletanolamina, la esfingomielina es el fosfolípido más importante de la membrana de hematíes. La esfingomielina que se acumula en pacientes con enfermedad de Niemann-Pick - (E.N.P.), surgió del recambio ya sea de alguna célula o componente celular, dando a las células ganglionares [7].

La acumulación de esfingomielina es el resultado de fagocitosis de materiales membranosos. El origen de tal material es la formación y modificación estructural de mielina o de membranas plasmáticas de células oligodendrogliales en el curso para convertirse a mielina. Parece que la superficie de la célula ganglionar y el axolema de fibras nerviosas contienen o elaboran enzimas que inician una alteración de la superficie de células oligodendrogliales. Una vez que este proceso ha empezado, y después de la pinocitosis y/o fagocitosis de sustancias tales como glucoproteínas y gangliósidos; las reacciones metabólicas necesarias para la eliminación de la porción de la membrana no requieren que ocurra la formación de mielina. Indicando lo anterior, un recambio local de la esfingomielina contenida en elementos celulares del cerebro [11, 97].

Célula de Niemann-Pick.

Las células de la E.N.P., son grandes, con apariencia espumosa, se encuentran por todo el sistema fagocítico mononuclear del paciente con la enfermedad. Estas células están diseminadas por el bazo, médula ósea, hígado, pulmones y nódulos linfáticos. Las células ganglionares sufren similar alteración patológica. Es fácil distinguir dichas células anormales por medio de microscopía por contraste de fases o electrofotomicroscopio. El tamaño de la célula N.P., es de 20 hasta 90 micrómetros de diámetro. El citoplasma está lleno de muchas gotas, en preparaciones incoloras la célula de apariencia de "mora". Las células usualmente contienen un sólo núcleo, aunque se han reportado algunas polinucleadas. También pueden contener un pigmento café cerúide (lipofuscina), algunas son claras, algunas amarillo-pálido, y otras café oscuro o verde olivo. Hay considerable variación en su cualidad tintorial cuando secciones de tejido son teñidas con hematoxilina y eosina, su rango de coloración va de gris-amarillo y verde-amarillo hasta café-amarillo. El material intracelular, el cual aparece con varias sombras azules ocasionalmente azul-verde en

médula ósea, da nacimiento al término "histiocitos azul-agua", pero tales células no están limitadas a la E.N.P., [40].

Las células espumosas tienen una configuración histiocítica normal con un pequeño núcleo típico localizado concéntricamente en la célula, el citoplasma contiene partículas lipídicas o citosomas lipídicos, que son generalmente poli-mórficas, con un rango de 1 hasta 5 micrómetros de diámetro. Las partículas usualmente consisten de figuras mielínicas laminadas concéntricamente con una periodicidad de aprox. 50 Å. Hay focos ocasionales de nódulos granulares negro sobre la superficie o incorporados entre las partículas. Los citosomas lipídicos han sido descritos en monocitos de sangre periférica de pacientes con E.N.P. Tipo D, pero éstas células no han sido encontradas en las otras formas de esta enfermedad. En el organismo, las células reticuloendoteliales hepáticas, esplénicas y de médula ósea, se encuentran aumentadas de tamaño, repletas de un compuesto lipídico y refrigente y de aspecto céreo, histológicamente presentan un aspecto espumoso y autofluorescencia uniforme (ver Figs. 10, 11 y 12) [40].

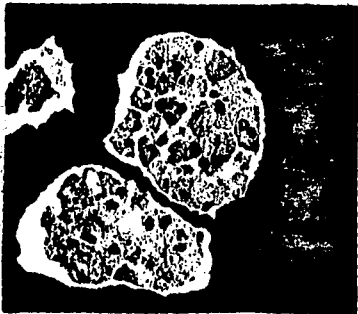


Fig. 10. Células espumosas en alveólos pulmonares en la E.N.P. (Hematoxilina-eosina).

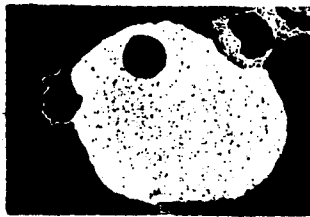
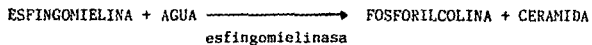


Fig. 11. Célula de almacenamiento en frotis de médula ósea, está llena de esfingomielina. Citoplasma más fino, que la célula de Gaucher. (Coloración de Wright).



Fig. 12. E.N.P. Células hinchadas y espumosas del asta anterior de la médula espinal.

La alteración se debe a un déficit enzimático, explicándose en base a la serie de experimentos que a continuación se detalla: se sintetizó esfingomieli-
na marcada en la porción colina de la molécula con radiocarbono ^{14}C . La enzi-
ma se halla localizada principalmente en los lisosomas pero las mitocondrias y
los microsomas presentan cierto grado de actividad de esfingomielinasa, proba-
blemente no debida a la concentración lisosómica de esta fracción subcelular.-
La enzima se obtuvo de forma solubilizada mediante tratamiento de los lisosomas
hepáticos con un detergente no iónico. Posteriormente se purificó empleando
métodos convencionales de fraccionamiento; los productos de la reacción son la
fosforilcolina y la ceramida: [46]



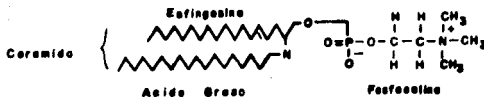


Fig. 13. Estructura de la Esfingomielina.

A continuación se determina el nivel de esfingomielinasa en preparaciones de hígado humano obtenidas de una serie de individuos testigos y de pacientes afectados con la E.N.P. El nivel medio de actividad de esfingomielinasa en el hígado de otros pacientes es de sólo un 7% de la normal (ver Tabla 4). Esto indica que la alteración metabólica primaria de la E.N.P. consiste de un déficit de esfingomielinasa en los distintos tejidos [16, 97].

El defecto metabólico de la enfermedad Tipo A, se confirma usando ^3H -dihidroesfingomielina aislada en forma natural y hecho radiactivo mediante reducción catalítica de el doble enlace de la porción esfingomielina con ^3H . Con este sustrato, la actividad de la esfingomielinasa resultó estar mucho más abajo en bazos de pacientes con enfermedad Tipo A y B, pero dentro del rango normal en pacientes Tipo C. Los mismos descubrimientos fueron reportados usando una prueba semicuantitativa con ^3H -dihidroesfingomielina y extractos de tejido de cerebro obtenidos de pacientes con E.N.P. [45].

| ACTIVIDAD ENZIMÁTICA | | | |
|----------------------|--------|---------------------------|-----------------------------|
| | HIGADO | LEUCOCITOS CIRCULANTES | FIBROBLASTOS EN CULTIVOS |
| A) FORMA INFANTIL | 3.5% | 0% | 6.5% |
| B) FORMA ADULTA | 18% | 17% | 10% |

Tabla 4. Actividad esfingomielinasa en tejidos y células de pacientes con enfermedad de Niemann-Pick.

Experimentos con ^{14}C colina-esfingomielina han revelado que la actividad de la esfingomielinasa es de 51-63% de lo normal en extractos de fibroblastos de piel cultivados y derivados de pacientes con enfermedad Tipo C. El defecto enzimático en pacientes Tipo D y E no parece claro; pues la actividad de la en

zima está cerca o es normal en el hígado de algunos miembros afectados del Tipo D. La actividad de la esfingomielinasa ha sido también encontrada por ser normal en cultivos de fibroblastos de piel de estos pacientes, mientras que - la actividad es definitivamente más baja de los niveles normales, en pacientes Tipo A, B y C, [18, 36].

La actividad de la esfingomielinasa es normal en extractos de fibroblastos cultivados de la médula ósea procedentes de pacientes Tipo E; sin embargo, se reportó como baja de fibroblastos de piel. Aunque la etiología de esta enfermedad y su relación con la actividad de la esfingomielinasa requiere más investigación [18].

La esfingomielina está incrementada de 3 a 7 veces de lo normal en nódulos linfáticos en pacientes Tipo A, B y C. Un moderado incremento se encuentra en la materia gris de cerebros de pacientes Tipo A; mientras que existe un pequeño incremento de este lípido en la materia blanca. La cantidad de esfingomielina no es alta en cerebros de pacientes con enfermedad Tipo B y C [18].

En adición al gran incremento de esfingomielina, elevadas cantidades de - estos lípidos son frecuentemente encontradas en órganos y tejidos de pacientes con E.N.P. En particular, hay un sustancial incremento en la cantidad de colesterol no esterificado (el nivel puede ir desde 2 hasta 7 veces más de la cantidad normal) en bazo de pacientes Tipo A. El colesterol en hígado está también elevado en pacientes N.P., pero no tanto como en el bazo, el incremento puede ser mayor que el de la esfingomielina en el hígado de pacientes con enfermedad Tipo D. El nivel de glicerolípidos ácidos ha sido también reportado por estar elevado en órganos sistémicos de pacientes N.P. Los niveles aumentados de colesterol y bis-monocilglicéridos no son específicos; pues ésta última sustancia se encuentra acumulada en otros desórdenes. Se concentra en lisosomas. La posible relevancia de esta distribución hacia la patogénesis de algunas formas de la E.N.P., es discutida más adelante [18].

Hay elevaciones dependientes de otros esfingolípidos en el cerebro de pacientes Tipo A. Estos compuestos incluyen glucocerebrósidos GM_3 y GM_2 . La razón de incremento de estos lípidos en particular no es clara, pero la acumulación es el resultado de la aglomeración de membranas o estructuras laminadas - membranosas de las células ganglionares con enfermedad Tipo A y C [18].

Por otro lado, la hepatomegalia puede ocurrir como resultado de una regeneración compensatoria positiva intentando suministrar cantidades de esfingomielinasa. La mayoría del tejido hepático con una baja de la actividad esfin-

gomielinasa, podría proporcionar una restauración parcial del equilibrio metabólico total. Sin embargo, no hay evidencia que indique si hay incremento simultáneo en el número de lisosomas funcionales en cada célula o si estas partículas elementales simplemente llegan a ser inactivas debido al ataque de componentes de membrana no catabolizables y son producidos para compensar aquellos dañados por lípidos acumulados. La cantidad incrementada de bis-monoacilgliceril-fosfato (y otras condiciones) sugieren que el número total de lisosomas está incrementado [19].

La observación de la patogénesis de la E.N.P., surge de una investigación de la distribución subcelular de la esfingomielinasa. La actividad específica de esta enzima fué encontrada en la enzima típica lisosomal: fosfatasa ácida - (Fig. 14). Esta distribución no usual de la esfingomielinasa impulsó la especulación de que se puede encontrar una alteración selectiva en la actividad esfingomielinasa en algunas de estas fracciones en ciertas formas de la E.N.P., en vez de una ausencia total aparente, como en la clásica forma Infantil Tipo A. La ausencia de partícula enlazada a esfingomielinasa fué observada más tarde en 2 niños con la E.N.P. Tipo C; surgiendo algunas observaciones preliminares, sometieron extractos de hígado humano a análisis isoeléctrico, encontrando 2 isoenzimas mayores de esfingomielinasa I y II, en el hígado normal; mientras que en un tejido de hígado proveniente de un paciente Tipo C, contenía sólo la isoenzima I; demostrándose ausencia de ambas isoenzimas en fibroblastos de piel cultivados en el Tipo A y un marcado decremento en la actividad de ambas isoenzimas en el Tipo B [18, 19].

Observándose que la actividad esfingomielinasa residual en el SNC de pacientes Tipo B es suficiente para catabolizar la esfingomielinasa que pudo haber sido eliminada durante la mielinización. Se sugiere que parte de la esfingomielinasa residual en pacientes Tipo B está en lisosomas, mientras que esta forma fué escasa en pacientes Tipo C, con un comienzo tardío de problemas en el SNC. Este concepto es también congruente con la presencia de estructuras laminares en las células ganglionares en el sistema nervioso de pacientes Tipo A y C; consistiendo en fragmentos membranosos no digeridos contenidos dentro de un lisosoma secundario [105].

Un segundo aspecto es el concerniente al fenómeno de inducción de actividad hidrolasa de esfingolípidos con la presencia de cantidades incrementadas de lípidos para ser catabolizados. Aunque puede ser sólo una mínima acumulación neta de esfingomielinasa si hay un incremento compensatorio de una apropiada

da isoenzima en el Tipo C, D o E. Como las isoenzimas están presentes en el cuerpo humano normal, puede ser que ellas tengan funciones separadas y la atenuación de una actividad particular puede causar la expresión fenotípica de la forma específica en la E.N.P., aún en la ausencia de un incremento neto demostrado de la esfingomielina en los tejidos [97].

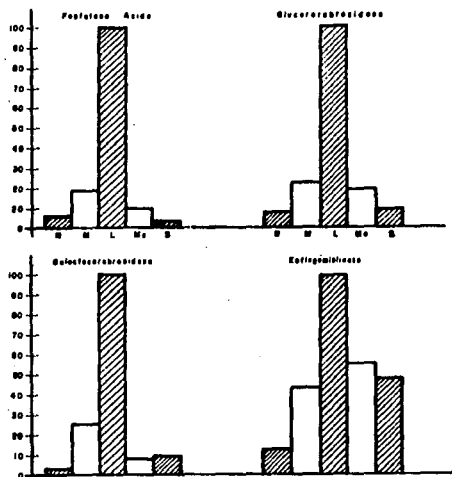


Fig. 14. Distribución subcelular de fosfatasa ácida y enzimas hidrolizantes de esfingolípidos en el hígado. Las fracciones son: Nuclear (N), Mitochondrial (M), Lisosomal (L), Microsomal (Mc) y Flotante (S).

Finalmente esto puede ser la explicación para la acumulación de más lípidos diferentes, tales como: colesterol y gangliósidos (GM_3 y GM_2). Parece que estas sustancias son derivados de fragmentos de membranas no catabolizadas; - donde la disminución de la actividad de alguna hidrolasa puede evitar el catabolismo de una fracción de membrana [97].

Debido a que la E.N.P. Tipo C representa un nuevo y único desorden por el acúmulo de colesterol; se han estudiado fibroblastos de pacientes N.P. Tipo C para elucidar el posible defecto de la esterificación del colesterol, lo cual puede ser la causa de la acumulación de colesterol no esterificado [60].

Cuando se cultivan células de mamíferos en presencia de suero, dichas células adquieren el colesterol por medio de un receptor mediador en la interiorización de LDL, la cual es liberada en lisosomas, donde la proteína cubierta de fosfolípidos es degradada y los ésteres de LDL-colesterol son hidrolizados hasta colesterol libre, el cual es usado por las células para la síntesis de membranas celulares, ácidos biliares y hormonas esteroides. Las células también reesterifican el colesterol derivado de LDL y almacenan los ésteres de colesterol en forma de gotas lipídicas en el citoplasma (Fig. 15). El colesterol derivado de LDL presenta algunas funciones reguladoras, incluyendo la supresión de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG CoA reductasa) y de la actividad de receptores LDL; así como una activación defectuosa en la expresión de la enzima acil-CoA: colesterol aciltransferasa (ACAT), [17, 60, 85].

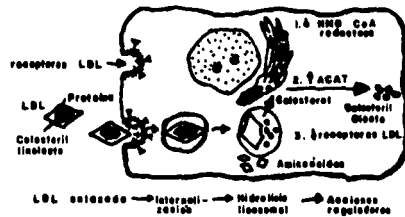


Fig. 15. Pasos secuenciales en el camino de receptores LDL de células en mamíferos. Las flechas verticales indican las direcciones de efectos regulatorios.

HMG Co A reductasa y ACAT interactúan para limitar la captación total de colesterol derivado de LDL y mantener niveles celulares de colesterol no esterificado dentro de un rango estrecho necesario para la síntesis de membranas y crecimiento celular. El defecto lisosomal en la translocación del colesterol no está solamente asociado con respuestas homeostáticas retrasadas, sino también con un enriquecimiento perjudicial de colesterol en las membranas plasmáticas. El colesterol derivado de la LDL por lisosomas intenta alcanzar el retículo endoplásmico y aparato de Golgi; la saturación como "charco" limitado de esteroides dentro del retículo endoplásmico inicia las numerosas respuestas homeostáticas que capacitan a las células normales para regular los niveles in

tracelulares de colesterol. Recordando que en condiciones normales existen receptores LDL que siguen una ruta donde el receptor LDL (Fig. 16) es sintetizado en el RER como un precursor que contiene grandes cadenas de carbohidratos. Aprox. 45 minutos después de la síntesis, los receptores LDL aparecen sobre la superficie celular, donde se acumulan cubriendo un espacio. De 3 a 5 minutos de su formación, los espacios cubiertos se invaginan para formar vesículas endocíticas cubiertas. Múltiples vesículas se funden para crear sacos más grandes de contorno irregular llamados endosomas o receptores. El pH de los endosomas está por debajo de 6.5, debido a la operación de la Adenosintrifosfato (ATP) que actúa como bomba de protones en la membrana. Con este pH ácido, la LDL se disocia del receptor; el cual retorna posteriormente a la superficie celular, aparentemente por agrupamiento con otros receptores en un segmento de la membrana endosomal que los captura para formar nuevamente una vesícula (recirculante). Una vez que llega hasta la superficie, el receptor se enlaza a otra partícula de lipoproteína y se inicia otro ciclo de endocitosis. La LDL que se disocia del receptor es liberada hasta un lisosoma cuando las membranas del endoplasma y lisosoma se fusionan. La proteína que compone la LDL es hidrolizada hasta lipasa ácida, liberando colesterol [17].

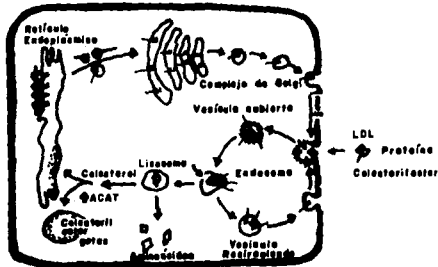


Fig. 16. Ruta del receptor LDL en células de mamíferos.

La relación entre el lisosoma de almacén y una deficiente movilización intracelular de colesterol en fibroblastos de N.P. Tipo C, sugieren que existe rompimiento de mecanismos intracelulares y la acumulación excesiva de colesterol puede representar una lesión primaria del mismo lisosoma [60, 85, 95].

La E.N.P., resulta ser un modelo patológicamente útil para aclarar los pa

tos adicionales que siguen con el colesterol intracelular; siendo necesario interromper el paso de la LDL hacia los lisosomas. Observándose que el bloqueo de la hidrólisis de ésteres de colesterol conducen a una acumulación de ésteres no hidrolizados en lisosomas y respuestas de homeóstasis retardadas [60, 95].

Se dan posibles explicaciones en cuanto a la escasa regulación mediada por el colesterol derivado de la LDL:

Primero: el transporte del colesterol derivado de la LDL hacia sitios celulares regulatorios puede ser defectuoso.

Segundo: el colesterol derivado de la LDL regula normalmente la homeóstasis del colesterol celular con un metabolismo mayor del colesterol no esterificado hacia un esteroil regulador. La presencia de 2 metabolitos reguladores potenciales: 24-S-5-epoxicolesterol y 25-hidroxicoolesterol, han sido reportados. Las células N.P. Tipo C son reguladas normalmente por 25-hidroxicoolesterol exógeno (prototipo del esteroil polar), pero no por LDL ya que no poseen la característica de esteroil polar [84].

Tercero: el colesterol derivado de la LDL puede alterar el contenido o actividad de un segundo mensaje regulatorio controlando el metabolismo del colesterol celular. Se ha postulado que los mediadores intracelulares son requeridos para la inactivación de la LDL por actividad de HGM CoA reductasa y la actividad de los inhibidores ACAT propuestos es abolida cuando las células son incubadas con LDL. Entonces si los mensajes secundarios están presentes, su contenido o actividad puede estar comprometida como resultado de la mutación en la E.N.P. Tipo C [81].

Como se ha señalado, los pacientes con E.N.P. Tipo A y B, acumulan grandes cantidades de esfingomielina debido a una deficiencia aguda en la actividad esfingomielinasa lisosomal. Sin embargo, la E.N.P. Tipo C es un enigma, pues la acumulación de esfingomielina es moderada a pesar de lo cercano a niveles normales de la actividad esfingomielinasa lisosomal. Una posible explicación en que el decremento de la actividad esfingomielinasa es una consecuencia de la acumulación del colesterol en los lisosomas; demostrando que el colesterol inhibe la actividad de la esfingomielinasa en hígado, siendo la acumulación de esfingomielina un efecto secundario del contenido incrementado de colesterol [60, 81].

Organos y Sistemas involucrados.

- Bazo:

Es uno de los órganos más afectados, pues la pulpa esplénica puede ser casi completamente reemplazada por células espumosas; el órgano es grande y firme, de margen redondeado, el color es más encendido que el normal, y rojizo. Las células de N.P. están usualmente distribuidas por todo el órgano, especialmente en la pulpa y alrededor de la pulpa arterial. A pesar de estar tan involucrado el bazo, sólo moderados cambios hemolíticos ocurren; estos pueden ser: anemia microcítica o trombocitopenia tardía en el curso de la enfermedad [16, 97].

- Hígado y Nódulos Linfáticos:

Existe aumento de 1.5 veces del tamaño normal del hígado y esto puede ocurrir antes de que los cambios histológicos puedan ser reconocidos. La distribución de las células que almacenan lípidos es irregular en las fases tempranas de la enfermedad. Más tarde existe infiltración masiva, las células de Kupffer y parenquimales llegan a transformarse en células de N.P. Las pruebas de funcionamiento hepático resultan normales, sin embargo, elevados niveles de fosfatasa alcalina en suero, TGO y TGP se presentan en la E.N.P. Tipo B. La causa de frecuente ictericia en la E.N.P. Tipo D no ha sido descubierta, un posible factor que contribuye es un agrandamiento de nódulos linfáticos en la región de la cabeza del páncrea. Los nódulos linfáticos agrandados son encontrados en la región mesentérica, hilos del bazo, hígado y pulmones. El timo y las tonsilas pueden ser infiltrados por células espumosas [16, 97].

- Sistema Oseo:

La médula está constantemente invadida por células espumosas en la E.N.P., el grado de infiltración varía con la duración y tipo clínico. Hay muy pocas evidencias de un extensivo proceso osteoporótico, pues las concentraciones de calcio, fósforo y células sanguíneas en suero, han sido normales en la mayoría de los pacientes N.P., [16, 97].

- Pulmones y Corazón:

Los pulmones en la mayoría de los pacientes tienen retículo difuso o infiltración nodular muy fina. Las células espumosas están presentes en los alveolos, vasos linfáticos y ramas de las arterias pulmonares, pero son raramente encontradas en esputo. En el corazón se encuentran adyacentes

tes a fibras del miocardio [16, 97].

- Otros órganos:

Las células de la lámina propia y músculo liso de intestino contienen células espumosas; éstas se han reportado en un 50% de los pacientes con E.N.P., en los glomérulos de riñón. Las adrenales están agrandadas y las células de N.P. pueden ser abundantes en la médula, sin evidencia de insuficiencia renal. Otras glándulas endócrinas como: gónadas, tiroides, pituitaria y, y glándulas exócrinas como: páncreas y glándulas salivares pueden mostrar acumulación de lípidos sin evidencia de impedimento funcional [16, 97].

- Sistema Nervioso:

Los pacientes con E.N.P. Tipo A y C, tienen cerebro atrófico, pesos entre 50 y 90% de lo normal. Las células ganglionares en el SNC están hinchadas, el citoplasma tiene vacuolas pálidas. Las inclusiones unidas a la membrana están libremente arregladas en estructuras concéntricas laminares dentro de las células. La arquitectura cortical está desorganizada debido a la pérdida de células de la corteza cerebral y cerebelar; gliosis en la materia blanca y gris, así como desmielinización secundaria en algunas porciones de la materia blanca. Las células espumosas están presentes en las leptomeninges, tela coroidea, endotelio y espacios perivasculares de los vasos sanguíneos del cerebro. Otras áreas tales como: ganglios basales, tallo cerebral, cordón espinal, ganglios autónomos y espinales puede también sufrir cambios morfológicos similares a aquéllos observados en la corteza cerebral [16, 97].

2.2.4 SINTOMATOLOGIA CLINICA.

La E.N.P., junto con la E.G., son las más frecuentes de las genopatías esfingolípídicas. En la E.N.P. se distinguen en general dos formas: la neurológica y caquetizante del lactante; y la puramente reticuloendotelial del niño. Al lado de estas dos formas, se ha identificado un Tipo C y otro D; finalmente se han individualizado los casos del adulto como un Tipo E.

Tipo A: Forma Aguda neuropática.

La mayoría de los pacientes con E.N.P., tienen esta forma de desorden. Los órganos viscerales y el SNC son afectados tempranamente en la infancia, y la enfermedad toma un curso fatal muy rápido.

Se manifiesta precozmente por trastornos digestivos; un deterioro psicomotor y aumento más o menos marcado del tamaño del hígado y bazo, que llega a ser improporcionante progresivamente a los 6 meses de edad. Debido a que los infantes tienen dificultad para alimentarse, llegan a adelgazar, pero tienen abdomen protuberante y extremidades delgadas. El niño está pálido, adquiriendo a veces una pigmentación amarillenta, su motilidad espontánea va disminuyendo, confirmando le una actitud de vientre inmóvil y piernas separadas; también existe deterioro progresivo de la capacidad intelectual. Las habilidades aprendidas se pierden gradualmente, sobreviniendo la hipotonía y flaccidez. Un aumento de histiocitos espumosos son encontrados en la médula ósea, pulpa esplénica, nódulos linfáticos, médula adrenal y alveolos pulmonares. Debe realizarse la búsqueda de linfocitos vacuolados, caracterizados por el aspecto nítido y redondo de algunas vacuolas intracitoplasmáticas que pueden ser observadas en el 10-50% de estas células en sangre periférica [45, 97].

Tipo B: Forma Crónica sin involucrar al Sistema Nervioso.

Los pacientes con esta forma de enfermedad pueden desarrollar signos viscerales tan pronto como los del Tipo A, aunque el adelgazamiento posterior es más típico. No hay evidencias de daño en el SNC, y algunos de estos pacientes tienen excepcional capacidad intelectual. La hepatoesplenomegalia es la primera manifestación del desorden. Los campos pulmonares tienen frecuentemente infiltrados extendidos. Existen pacientes con incrementada susceptibilidad para la naumonía [97].

Tipo C: Forma Crónica neuropática.

Estos pacientes usualmente parecen normales entre 1 y 2 años de edad y algunas veces hasta más grandes. Ellos gradualmente desarrollan anomalías neurológicas las cuales se manifiestan por pérdida de lenguaje, moderada ataxia y ataques. La hepatoesplenomegalia es menor que en los Tipos A y B. El curso clínico es caracterizado por daño progresivo del cerebro con falla mental y pericia motora, hipertonia, reflejos hiperactivos, incrementándose la frecuencia de los ataques. Macrófagos espumosos - están presentes en la biopsia de médula ósea [60].

Tipo D: Variante Nueva Escocia.

Obedece a una mutante bien individualizada

da por su aparición en una fracción limitada de población de Nueva Escocia, resultado de numerosos matrimonios consanguíneos. El padecimiento es parecido al Tipo C, con un curso prolongado y anomalías neurológicas, las cuales aparecen entre el 2o. y 4o. año. Los pacientes tienen hepatoesplenomegalia, un paso inconstante al caminar, coordinación dañada, ataques y deterioro gradual de la función mental que comienza a edad temprana. Las células espumosas están presentes en el bazo y nódulos linfáticos, y muchos de estos pacientes están ictericos [16, 97].

Tipo E: Forma Adulta no neuropática.

Un pequeño número de pacientes adultos sin dificultades neurológicas pero con moderada hepatoesplenomegalia y células espumosas en médula ósea han sido reportados por tener una forma variante de la E.N.P. sobre las bases de algún incremento en la cantidad de esfingomielina en el hígado y bazo. Algunos pacientes han presentado mínima organomegalia, pero con las células espumosas en la médula y la mancha rojo-cereza en el fondo del ojo. También se presenta ataxia cerebral [4, 87, 97].

2.2.5 INCIDENCIA.

La mayoría de los pacientes con E.N.P. son descendientes de Ashkenazic Jewish. Esta distribución es predominante en el Tipo A, aunque también se presentan en las Formas B, C y E. La frecuencia establecida es de 1 en 100 individuos de descendencia Ashkenazic Jewish. En contraste, pacientes con el Tipo D provienen de un grupo consanguíneo de Acadienses, en la Ciudad de Yarmouth en Nueva Escocia, cuyos descendientes es una mezcla de francés e italiano católicos. La incidencia de esta forma es muy baja [97].

2.2.6 PRONOSTICO.

En el Tipo A, los pacientes usualmente mueren al tercer año de vida. La evolución del Tipo B es prolongada, pero conduce a la muerte antes de llegar a la edad adulta. La mayoría de los pacientes con el Tipo C mueren entre los 5 y 15 años de edad. Considerándose similar el Tipo D. En el paciente Tipo E, la muerte sobreviene entre los 30 y 40 años de edad [97].

2.2.7 DIAGNOSTICO.

Un diagnóstico presuntivo de la E.N.P. Tipo A, puede ha-

cerse generalmente en base a la hepatoesplenomegalia y retraso en el crecimiento. A menudo, la piel presenta un tinte pardo amarillento céreo. Puede encontrarse ictericia y también ligera linfadenopatía. En 30-50% de los casos infantiles, se observa en la mácula una zona roja y brillante (debida a degeneración neuronal). Con frecuencia existe un retículo difuso y moteado en los campos pulmonares en placas radiológicas. Llega a encontrarse trombocitopenia leve o moderada; los monocitos y linfocitos de sangre periférica pueden mostrar algunas vacuolas citoplasmáticas pálidas, de 0.5-1.0 micras de diámetro. El sistema nervioso está afectado, aunque no siempre en el mismo grado, y las manifestaciones más comunes son retraso mental y trastornos motores progresivos. Frente a un cuadro de este tipo, el hallazgo de células espumosas "en mórula" en los frotis de médula ósea, cuyo citoplasma está lleno de pequeñas gotas de lípidos como "burbujas de jabón" confirma el diagnóstico; las gotitas de las células espumosas siempre son positivas al PAS, y dan color rojo con Rojo de Sudán; negro con Negro de Sudán y violeta-azuloso con Sulfato de Azul Nilo [62].

Es mucho más difícil hacer un diagnóstico del Tipo B o C. Es conveniente tener evidencia de la acumulación de la esfingomielina, pero el diagnóstico de estas formas de la E.N.P., debe ser confirmado por ensayos enzimáticos. Los procedimientos para medir la cantidad de esfingomielina en una muestra de hígado, bazo o riñón obtenidos por biopsia están bien establecidos [90].

Las enfermedades Tipo A y B son diagnosticadas más fácilmente por demostración de la baja actividad de esfingomielinasa en extractos de tejido usando esfingomielina (radioactiva) marcada con ^{14}C , [14].

Un avance en el mejoramiento del diagnóstico de la E.N.P., se ha realizado mediante la síntesis de una estructura análoga a la esfingomielina con un gran potencial cromogénico, y se utiliza como sustrato: 2-N-acilamido-4-nitrofenil-fosfocolina (HNP), que es hidrolizado hasta 2-N-acilamido-4-nitrofenolato + fosforilcolina, por acción de la esfingomielinasa purificada del tejido humano (Fig. 17); [97].

La presencia de la E.N.P., puede ser rápidamente descubierta por ensayos de la actividad esfingomielinasa en extractos de leucocitos obtenidos de pequeñas muestras de sangre venosa. Las preparaciones de leucocitos deben estar libres de eritrocitos contaminantes, y es preferible hacer el ensayo con leucocitos frescos. La esfingomielina [^{14}C], es el sustrato de elección para estos ensayos, además de que es ligeramente más sensible que el sustrato HNP. El tejido más fácil y seguro para el diagnóstico del Tipo A, B o C, es el de fibro-

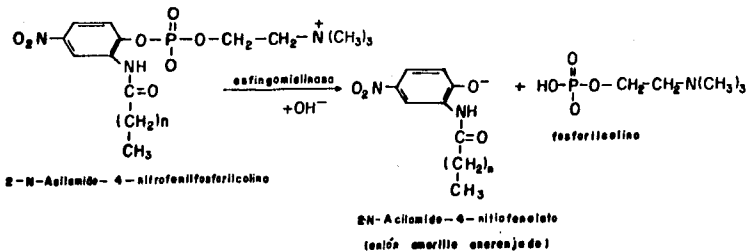


Fig. 17. Sustrato artificial para la determinación de esfingomielinasa.

blastos de piel cultivados, usando como sustrato cualquiera: [^{14}C]-esfingomielina o HNP [47].

La actividad esfingomielinasa en fibroblastos cultivados de pacientes Tipo D está dentro del rango normal. Al mismo tiempo, no es posible juzgar si los cambios selectivos en las isoenzimas de la esfingomielinasa serán descubiertos en pacientes con esta forma de enfermedad o si esta condición es debida a un disturbio metabólico diferente por completo. Es muy probable que estos grupos corresponden a variaciones del defecto químico enzimático, esto debería traducirse en diferencias de concentraciones relativas de esfingomielina y colesterol, pudiendo variar además los ácidos grasos de esfingomielina en ciertos casos [97].

La actividad de esfingomielinasa en fibroblastos cultivados derivados de pacientes con Tipo E puede estar dentro del rango normal, aunque una alteración en la isoenzima esfingomielinasa ha sido reportada. El nivel sérico normal de esfingomielina no se incrementa, por lo que la E.N.P., no se puede diagnosticar por un simple análisis sérico. En algunos casos se encuentran aumentados: el colesterol y la grasa neutra [23, 62, 97].

2.3 GANGLIOSIDOSIS.

2.3.1 HISTORIA.

En 1881 Warren Tay, un oftalmólogo inglés, fue el primero en descubrir un error en el metabolismo de los gangliósidos; esto es ahora conocido como enfermedad de Tay-Sachs o Gangliosidosis GM_2 . Un segundo desorden, la Gangliosidosis GM_1 , fué descrita 84 años más tarde, en 1965. En la actualidad algunos subtipos de ambas gangliosidosis son conocidos, incluyendo desórdenes en jóvenes y adultos. Cada uno debido a defectos metabólicos en los gangliósidos, resultado de deficiencias en glucohidrolasas de gangliósidos [97].

2.3.2 DEFINICION.

Esta lipodistrofia se caracteriza por acumulación de gangliósidos (glucoesfingolípidos) principalmente en neuronas. De acuerdo al gangliósido (GM_1 o GM_2) almacenado, la enfermedad se presenta en 5 Tipos: [97]

- Gangliosidosis GM_1 Tipo 1: Gangliosidosis Infantil
- Gangliosidosis GM_1 Tipo 2: Gangliosidosis Juvenil
- Gangliosidosis GM_2 Tipo 1: Enfermedad de Tay-Sachs
- Gangliosidosis GM_2 Tipo 2: Enfermedad de Sandhoff
- Gangliosidosis GM_2 Tipo 3: GM_2 Juvenil.

2.3.3 PATOFISIOLOGIA.

Origen de los gangliósidos acumulados.

En el cerebro, los gangliósidos están localizados principalmente en membranas de terminaciones nerviosas, que se originan en el cuerpo celular y se mueven hasta el final del nervio por un rápido transporte axonal. Axones, migraña, astrogliá y oligodendrogliá tienen un menor contenido de gangliósidos que las terminaciones neuronales. Sin embargo, el cerebro tiene el más alto contenido, aunque los gangliósidos están presentes en la mayoría de las células del cuerpo así como en cultivos celulares [34].

La biosíntesis de gangliósidos en el sistema nervioso de mamíferos involucra la adición de unidades de monosacáridos. El primer azúcar: glucosa, es adicionado al grupo hidroxilo de la ceramida; los azúcares restantes se adicionan entonces en las terminaciones no reducidas de la cadena oligosacárida. La glu

cosiltransferasa cataliza la transferencia de cada unidad monosacárida, y las unidades glucosa son donadas por los nucleótidos correspondientes (Fig. 18).

La formación de GM_1 involucra la adición de 5 azúcares en secuencia estricta por una multiglucosil transferasa. Sistema compuesto de 5 diferentes glucosil transferasas:

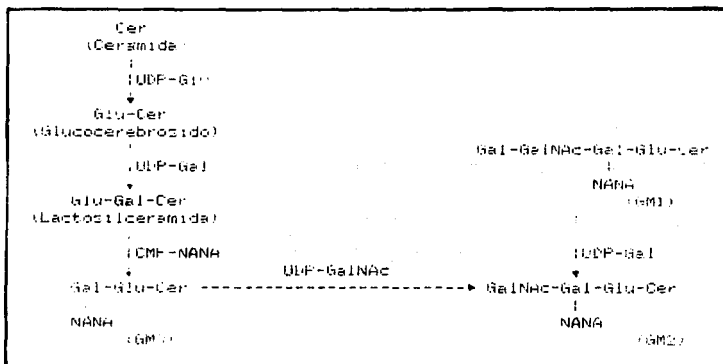


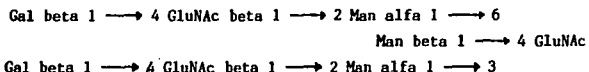
Fig. 18. Formación de GM_1 , GM_2 y GM_3 , por adición de azúcares.

Química de las sustancias almacenadas.

La composición del azúcar, ácido graso, secuencia de azúcares y enlaces glucosídicos de los compuestos almacenados es idéntica a la del gangliósido normal GM_1 (Fig. 19). El GM_1 almacenado es aprox. 10 veces mayor al valor normal en la materia gris, tanto en la forma Infantil como en la Juvenil. El sigilo derivado del GM_1 (GA_1) (Fig. 19), también se acumula en el cerebro casi 10 veces más de lo normal. Las glicoproteínas conteniendo galactosa se acumulan en vísceras las proporciones equimolares son de glucosamina y galactosa. Una segunda glicoproteína, conteniendo residuos de ácido siálico, así como glucosamina y galactosa, se acumula en hígado y bazo. Niveles elevados de glicoproteína-galactosa, se han encontrado en pacientes con prominentes deformidades -

6seas [113].

Una galactoglicoproteína, similar a la glicoproteína del estroma eritrocítico, es acumulada en pacientes con el Tipo Infantil. El compuesto contiene -N-acetilglucosamina, manosa y galactosa, pero escaso ácido neuramínico:



Este compuesto y los dos anteriores pueden ser derivados de las glicoproteínas del estroma eritrocítico; donde el metabolismo normal está dañado por la deficiencia de beta-galactosidasa [113].

La deficiencia de beta-galactosidasa no es debida a la presencia de inhibidores endógenos solubles. La actividad de otras enzimas lisosomales, incluyendo fosfatasa ácida, beta-galactosidasa y beta-N-acetilglucosaminidasa, está normal o incrementada, la beta-galactosidasa presenta una actividad disminuida hacia el gangliósido GM₁; ésta es menor de 0.1% de lo normal en el cerebro, hígado y fibroblastos cultivados. El bloqueo metabólico involucra el primer paso en el rompimiento de GM₁ (Fig. 19). Algunas beta-galactosidasas diferentes; utilizando sustratos sintéticos, están en tejidos humanos. Dos de estas isoenzimas A y B, son deficientes en la GM₁. La actividad de una tercera beta-galactosidasa, llamada neutral varía, llegando algunas veces a elevarse o a disminuirse [74].

La mayor isoenzima ácida: beta-galactosidasa A, ha sido purificada a partir de una muestra de hígado humano, la beta-galactosidasa B y la neutral se han estudiado en estado parcialmente purificado [77].

Las beta-galactosidasas A y B poseen un pH óptimo de 4.2-4.4 en la región ácida. Ambas son estimuladas y estabilizadas por cloruro de sodio, son termolábiles, hidrolizan la beta-galactosa del GM₁. La beta-galactosidasa B tiene un peso de 600,000 a 800,000; casi 10 veces más alto que A; (72,000); se sabe que bajo condiciones apropiadas la isoenzima A puede ser generada a partir de B. La beta-galactosidasa neutra, tiene un pH óptimo de 5.8 y su peso molecular es más bajo: 57,000. Puede ser inhibida por cloruro de sodio y es más estable al calor que A o B. Esta isoenzima no se une a la galactosa del GM₁ [74].

Inicialmente, pacientes con GM₁ Tipo 1, parecían tener mucho más baja actividad de la beta-galactosidasa neutral que aquellos con el Tipo 2, confirmán

dose después que se trataba de un error.

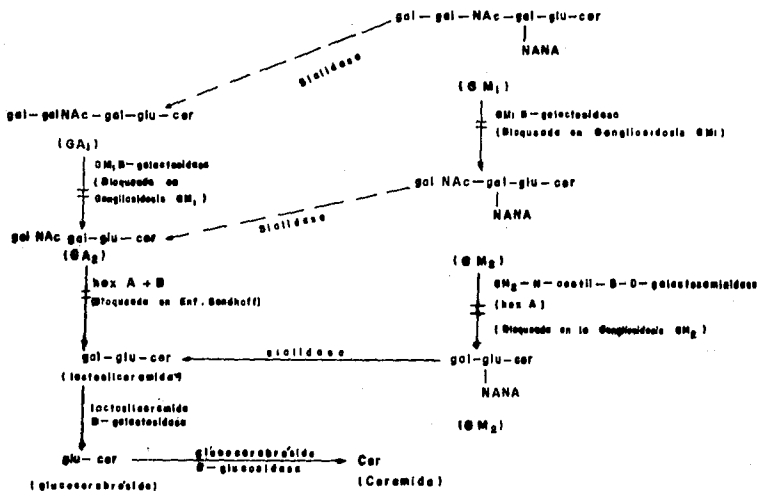
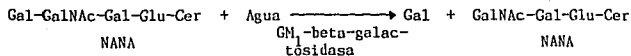


Fig. 19. Esquema que muestra los posibles bloques enzimáticos que dan como consecuencia las diferentes gangliosidosis.

En relación con la isoenzima A se propone que los pacientes Tipo 2 pueden ser: A (+), y pacientes Tipo 1: A (-), y que la beta-galactosidasa neutral no está involucrada en la patogénesis de la GM₁ [75, 97].

En general se dice que la enfermedad GM₁, se debe a un déficit de la enzima GM₁ gangliósido-beta-galactosidasa que cataliza la hidrólisis de la molécula terminal de galactosa de los monosialitetrahexosil-gangliósidos:



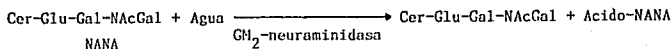
Los pacientes afectados de esta enfermedad presentan una disminución de la actividad hística total de beta-galactosidasa. Debido a la disminución drástica de galactosidasa, puede esperarse la acumulación de otras sustancias que poseen una molécula de galactosa terminal como: galactocerebrósido o el ceramida-galactósido; sin embargo, este fenómeno no se ha observado nunca. El gangliósido que se acumula en esta enfermedad puede proceder de la reposición de los componentes de la membrana plasmática de diversas células, ya que estas estructuras contienen una elevada concentración de gangliósidos [16, 89].

Patología de la Gangliosidosis GM₁.

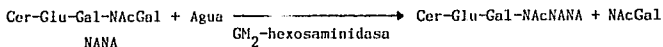
En el cerebro los niveles de gangliósidos GM₂ están incrementados de 100 hasta 300 veces más de lo normal en las enfermedades de Tay-Sachs y Sandhoff, el sialo-derivado del gangliósido GM₂ (GA₂) se acumula en cantidades casi 20 veces mayores de lo normal. Cantidades más altas de GA₂ se acumulan en el cerebro y vísceras de la enfermedad de Sandhoff que en la de Tay-Sachs. El globósido se acumula en grandes cantidades en vísceras, especialmente: riñones y bazo en la enfermedad de Sandhoff. En la GM₂ Juvenil, los niveles cerebrales de GM₂ y GA₂ están marcadamente incrementados, pero no al grado observado en la enfermedad de Tay-Sachs o Sandhoff. En el hígado y bazo, una ligera elevación del gangliósido GM₂ ha sido observada [67].

Dos isoenzimas de hexosaminidasa fueron primero demostradas en bazo humano [15]; ambas están presentes en la fracción lisosomal. La hexosaminidasa A (hex A), está más negativamente cargada y es más lábil al calor que la hexosaminidasa B (hex B). Ambas hexosaminidasas (A y B) han sido encontradas en todos los tejidos humanos normales (excepto en eritrocitos), tales como: leucocitos [80], suero [78], orina, fibroblastos de piel cultivados, fluido amniótico y células amnióticas cultivadas. Una tercera enzima denominada hexosaminidasa C (neutra) ha sido determinada, pero parece no ser lisosomal y no está relacionada con las hexosaminidasas A y B [89].

En la enfermedad de Tay-Sachs (E.T.S.), la actividad de la hex A está casi ausente. En el cerebro la actividad de la hex B está incrementada casi 10 veces y es debido a la estimulación lisosomal secundaria para el almacén de gangliósido. En el cerebro de los mamíferos, el catabolismo del GM₂ se produce gracias a la hidrólisis del residuo de ácido-N-acetilneuramínico [54]. Su fórmula es la siguiente:



Para estudiar el metabolismo del GM_2 se preparó GM_2 marcado en la porción N-acetilgalactosaminilo; utilizando este sustrato marcado se determinó que el catabolismo cerebral de GM_2 puede iniciarse mediante degradación de la molécula de ácido-N-acetilneuramínico, o por degradación de la molécula N-acetil-galactosamina: la fórmula es:



Esta hexosaminidasa está casi totalmente ausente en el tejido cerebral obtenido de pacientes T.S. En cambio, la actividad de la GM_2 -neuraminidasa es idéntica en los controles y pacientes. Esta observación está de acuerdo con el concepto de que la isoenzima A de la hexosaminidasa está alterada en la E.T.S., e interviene en el catabolismo de GM_2 . Ambas isoenzimas catalizan la hidrólisis de los sustratos aminoazúcares. En los tejidos de los pacientes con la enfermedad de Sandhoff (E.S.), existe una reducción de ambas isoenzimas (A y B), así como acumulación de globósido en órganos periféricos, ello implica que la hex B participa en el catabolismo del globósido. El tercer tipo de la E.T.S., recibe el nombre de variante AB (juvenil), encontrándose presentes tanto hex A como hex B en tejidos, sin embargo, estos enfermos presentan una alteración del catabolismo del GM_2 [106].

Se sugiere que por lo menos en parte, el catabolismo de GM_2 realizado por la hexosaminidasa se produce por la acción de la hex B en pacientes con la forma B. Además, el GM_2 acumulado podría actuar como inhibidor de la hexosaminidasa y puede también inhibir el catabolismo del GM_2 a través de hex B. Otro factor que puede tener una considerable importancia en la patogenia de la E.T.S., consiste en la diferencia entre el pH óptimo de la GM_2 -neuraminidasa y el de la GM_2 -hexosaminidasa con los lisosomas cerebrales. El pH es 4.4 y 5.1 respectivamente. En la actualidad resulta aún imposible ver la acidez en el interior de los lisosomas, pero es posible que la concentración de hidrogeniones en el microambiente de estas enzimas puede regular y dirigir el catabolismo del GM_2 a través de estas vías alternas en el cerebro [106].

Los pacientes T.S. apenas presentan acumulación de GM_2 en órganos perifé-

ricos y tejidos. Este fenómeno puede ser debido a diferentes factores, uno de los cuales sería el pH óptimo de la GM_2 -neuraminidasa extraneuronal es de 5 y en consecuencia, distinto del de la enzima cerebral. Por otra parte, la cantidad de GM_2 en los tejidos periféricos es muy inferior a la presente en el cerebro, por lo que es posible que se catabolice a través de la neuraminidasa en dichos tejidos y que el producto de esta reacción sea degradado por la hex B con rapidez suficiente para evitar la acumulación en dichos órganos. Además, la actividad específica de la GM_2 -neuraminidasa en ciertos tejidos periféricos es muy superior a la que está enzima presenta en el cerebro. Existe aún otro mecanismo que puede contribuir a la acumulación de GM_2 en la E.T.S. El organismo puede sintetizar hex A inactiva (materia que reacciona en forma cruzada), proteína que puede hallarse en concentraciones superiores a las normales en el cerebro de pacientes T.S. Se ha planteado la posibilidad de que esta enzima no reactiva (o un fragmento de ella) se uniese al GM_2 e impida su catabolismo a través de la GM_2 -neuraminidasa. A este respecto, la observación más importante ha consistido en la detección de una acumulación notable de GM_2 en lisosomas [97, 106].

Por otro lado, el estudio histológico del cerebro pone de manifiesto neuronas hinchadas en diversos estadios de degeneración, muchas de las cuales contienen cuerpos citoplasmáticos membranosos (CCM) dispuestos en forma concéntrica que proceden de los lisosomas y formados por proteínas, colesterol, fosfolípidos y el gangliósido GM_2 , cuya presencia es patognomónica. Se acumula también en el cerebro otro esfingolípido que recibe el nombre de gangliósido sialo-Tay-Sachs (GA_2), pero su concentración es menor a la de GM_2 . En las fases tardías de la enfermedad se produce una acumulación moderada de ceramida-lactósido y un ligero aumento de glucocerebrósido. Todas estas sustancias se acumulan en las neuronas del plexo mesentérico [16, 97, 104], (ver Fig. 20):



Fig. 20. CCM en la neurona de un paciente con la E.T.S.

2.3.4 SINTOMATOLOGIA CLINICA.

En general las gangliosidosis se caracterizan

por:

- a) Un deterioro mental y motor progresivo a partir de la niñez y con consecuencias fatales.
- b) Lipidosis neuronal secundaria por almacén de GM_2 o GM_1 .
- c) Almacén de glicolípidos relacionados estructuralmente, polisacáridos o glicoproteínas.
- d) Ausencia o severa deficiencia de glicohidrolasas lisosomales específicas [97].

Gangliosidosis GM_1 .

- GM_1 Infantil o Tipo I:

En el Tipo I (gangliosidosis generalizada), involucra alteraciones óseas, los síntomas aparecen al nacer o poco después. Edema de extremidades está presente; el apetito es bajo; la fuerza para amamantarse es débil y el peso que gana es subnormal. La deglución inefectiva puede ocasionar la utilización de sonda. El paciente puede alzar la cabeza, pero usualmente no se sienta ni gatea; la respuesta sensorial es baja, se dificulta la respiración y es irregular, la bronconeumonía recurrente es frecuente, así como las convulsiones. Si logra sobrevivir después de un año, el aspecto clínico es de rigidez de cerebro con ceguera, sordera, cuadriplegia espasmódica [97].

La apariencia es de infante lerdo, hipoactivo, hipotónico. Las anomalías faciales incluyen protuberancia frontal, caballete nasal hundido, orejas grandes y bajas; y rasgos duros. Hipertrofia gingival y macroglosia están presentes, las córneas son usualmente claras, manchas rojo-cereza en el fondo del ojo (idéntica a la observada en la E.T.S.), están presentes en casi la mitad de los pacientes. La hepatoesplenomegalia es evidente dentro de los primeros meses de vida, se puede desarrollar macrocefalia, pero esta no es tan frecuente ni tan masiva como en la E.T.S. Deformaciones en vértebras y huesos largos, -pelvis, manos y pies, costillas espatuladas. Los cambios patológicos incluyen lipidosis neuronal, histiocitosis visceral y células epiteliales del glomérulo renal con citoplasma aumentado. Las neuronas contienen numerosos CCM. Histiocitos viscerales predominan por todo el sistema fagocítico mononuclear. Los histiocitos espumosos (Fig. 21), son encontrados en médula ósea, hígado, bazo,

nódulos linfáticos y además órganos viscerales. Ocasionalmente cuerpos lipídicos laminados son vistos en estas células [22, 39].

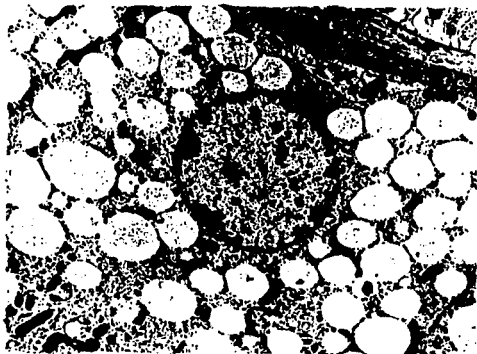


Fig. 21. Histiocito espumoso.

GM₁ Juvenil o Tipo 2:

El comienzo es tardío, el curso es más lento, y - las anomalías óseas son más leves. El apetito es bueno, el peso ganado es adecuado y el desarrollo mental no está retrasado, en el primer año. La ataxia locomotora en el primer año de edad es el síntoma inicial. Estrabismo interno, pérdida de la manipulación coordinada en los movimientos de las manos, pérdida del habla, debilidad moderada y generalizada en ambas extremidades superiores e inferiores son los síntomas tempranos. El deterioro mental y motor progresa rápidamente. Existe pérdida sensorial, falta de interés y letargo, - espasticidad progresiva de extremidades superiores e inferiores, y con el tiempo un estado de rigidez cerebral es alcanzado. Ataques frecuentes ocurren después de los 16 años de edad y puede constituir un problema mayor. Infecciones recurrentes, especialmente la bronconeumonía, son problemas constantes y pueden ocasionar la muerte. No son evidentes rasgos faciales duros. Las córneas están usualmente claras, la retina y mácula parecen normales; puede ocurrir ceguera. Los linfocitos están vacuolados, y los histiocitos espumosos aparecen en la médula ósea. La hepatosplenomegalia está ausente. Las alteracio

nes óseas pueden aparecer desde los 7 meses de edad y presentarse antes de la sintomatología neurológica. Los cambios patológicos incluyen lipidosis neuronal, histiocitosis visceral aunque no tan florida como en la forma Infantil, y el aumento citoplasmático del glomérulo renal; que son similares a los de la forma Infantil [97].

Gangliosidosis GM_2 .

- Enfermedad de Tay-Sachs (GM_2 Tipo 1):

Existe debilidad motora entre los 3 y 6 meses de edad; reacciones de sobresalto, pero no necesariamente con ruidos fuertes, son características de signos tempranos. Después de los 6 meses de edad, la estabilidad motora es obvia. El niño puede gatear, sentarse solo y se esfuerza por mantenerse de pie, pero usualmente no puede caminar. El deterioro motor y mental progresa rápidamente después de 1 año de edad. La alimentación llega a ser un problema debido a la deglución con dificultad. El tono muscular es pobre, se desarrolla parálisis generalizada. Después de los 18 meses existen: sordera, convulsiones, ceguera, espasticidad y un estado de rigidez cerebral. La muerte usualmente es debida a bronconeumonía [16].

Muchos pacientes tienen cara de "muñeca" con apariencia pálida, piel translúcida, pestañas grandes, pelo fino y delicada coloración rosada. Manchas rojo-cereza en la región macular están presentes en cerca del 95% de estos pacientes. Esta lesión puede parecer una mancha pintada en los primeros días de vida, pero gradualmente se desarrolla dentro de una mancha definida circular roja dentro de un halo blanco; más tarde la mancha llega a oscurecerse conforme se degenera la mácula y venas blanquecinas opacas a lo largo de los vasos pueden aparecer [97].

Los cambios patológicos incluyen lipidosis neuronal sobresaliente. El citoplasma de muchas neuronas está lleno y distendido, el núcleo es desplazado a la periferia. CCM se acumulan dentro de las neuronas, estos tienen un espesor de 50 Å (Fig. 20). Los cuerpos tienen intensa actividad de fosfatasa ácida y después de aislarlos se ha comprobado que tienen una gran cantidad de GM_2 . La desmielinización central ocurre y parece ser secundaria a una degeneración axonal. Los cambios patológicos no son evidentes en órganos viscerales, y la gliosis cortical es prominente [79].

- Enfermedad de Sandhoff (GM₂ Tipo 2):

El aspecto clínico y patológico es similar a los de la E.T.S. La debilidad motora aparece dentro de los primeros 6 meses de edad. Reacciones de sobresalto provocadas por ruidos, ceguera temprana, deterioro mental y motor progresivo, aspecto de "muñeca", mancha rojo-cereza y macrocefalia están presentes. Linfocitos vacuolados no son prominentes. Histiocitos espumosos ocasionalmente han sido encontrados en la médula ósea. La muerte es debida a bronconeumonía. Los cambios patológicos en la corteza casi son idénticos a los de la E.T.S. La lipidosis cortical, cerebral, espinal y en neuronas autónomas es prominente. Histiocitos vacuolados están presentes en pulmones, bazo, nódulos linfáticos y médula ósea; pero el grado de histiocitosis es menor que el observado en las enfermedades de Gaucher y Niemann-Pick. La vacuolización de células del epitelio tubular del asa de Henle renal puede ser prominente. Estudios ultraestructurales revelan inclusiones laminares intracelulares, en dichas células [97].

- Gangliosidosis Juvenil (GM₂ Tipo 3):

Aparece entre los 2 y 6 años de edad. La ataxia locomotora es el síntoma inicial más prominente; pérdida del habla, progresiva espasticidad y ataques motores menores siguen. Todos los pacientes presentan rigidez cerebral. La ceguera ocurre en forma tardía comparada con la E.T.S. y Sandhoff, la atrofia óptica con retinitis pigmentosa puede estar en los estados terminales de la enfermedad, pero la lesión macular ha sido reportada sólo una vez. La muerte es debida a bronconeumonía secundaria. Hepatoesplenomegalia, deformaciones óseas, vacuolización de linfocitos y células espumosas en la médula ósea no han sido descritas. La lipidosis neuronal es prominente, las neuronas contienen inclusiones citoplasmáticas tipo mixto. CCM, similares a los de la E.T.S. y Sandhoff, están presentes, pero otros cuerpos, con una ordenación más al azar, llamados cuerpos laminares pleomórficos están también presentes. La histiocitosis visceral no ha sido descrita [67].

- Gangliosidosis Crónica (GM₂ Tipo Adulto):

Deterioro progresivamente lento al caminar y en las posturas; atrofia muscular, pies caídos, ataxia media, rasgos distónicos, todo ello sugiere una degeneración espinocerebral. La visión e inteligencia son normales, existe decremento de hex A en suero y leu-

cocitos. El tejido cerebral contiene elevados niveles de GM_2 , pero se cree que esta gangliosidosis se presenta como consecuencia de un problema de degeneración cerebral o cerebelar familiar, por lo tanto, no se ha establecido si se trata de una gangliosidosis GM_2 neta, además el número de pacientes es muy bajo [97].

2.3.5 INCIDENCIA.

La gangliosidosis se produce principalmente en niños de origen judío, raza Ashkenazi Jewish; aunque se ha registrado en todos los grupos étnicos, pero la frecuencia en individuos no judíos es 100 veces menor que en los Ashkenazi Jewish [68].

Aunque la distribución a nivel mundial, sobre todo de la E.T.S., comprende pacientes de origen: Italiano, Francés, Español, Inglés, Húngaro y Puerto Ricano [16, 68, 106].

2.3.6 PRONOSTICO.

- GM_1 Infantil: Generalmente mueren entre 1 y 2 años de edad debido a bronconeumonía.
- GM_1 Juvenil: En estos pacientes el promedio de vida alcanzado varía entre los 3 y 10 años.
- Tay-Sachs: Los pacientes usualmente mueren por bronconeumonía máximo a los 3 años de edad.
- Sandhoff: La muerte ocurre cerca de los 3 años de edad.
- GM_2 Juvenil: La muerte sobreviene entre los 5 y 15 años de edad, en forma secundaria a la bronconeumonía [97].

2.3.7 DIAGNOSTICO.

- Gangliosidosis GM_1 :

En esta enfermedad la actividad beta-galactosidasa está disminuida hasta menos de 0.1% de lo normal en el cerebro, hígado y fibroblastos cultivados. La actividad beta-galactosidasa es también deficiente al utilizar keratán sulfato enlazado a glicoproteína almacenada y asialofetina como sustratos. Usando GM_1 y beta-galactopiranosido (Fig. 22), existe una se-

vera deficiencia de la beta-galactosidasa en fibroblastos de piel cultivados.

El diagnóstico de la GM₁ puede ser confirmado por ensayo de la beta-galactosidasa en leucocitos, orina y fibroblastos de piel cultivados. Un sustrato histoquímico útil es el 5-bromo-4-cloro-3-inoilil-beta-D-galactósido, donde las células de individuos afectados fallan para hidrolizar este compuesto hasta un derivado indol colorido [91, 107].

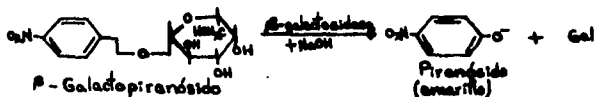


Fig. 22. Sustrato cromogénico artificial para el diagnóstico de la GM₁.

- Gangliosidosis GM₂:

Las dos isoenzimas hexosaminidasas: hex A y hex B, están presentes en la fracción lisosomal, pero pueden separarse mediante cromatografía de columna por intercambio iónico o electroforesis en gel-almidón. La hex A, está cargada más negativamente y es más lábil que la hex B, ambas se han encontrado en células y fluidos humanos normales (excepto en eritrocitos) tales como: leucocitos, suero, orina, lágrimas, fibroblastos de piel cultivados, fluido amniótico y células amnióticas cultivadas [71, 78].

En la E.T.S., la actividad de la hex A, está casi ausente. La deficiencia se demuestra usando 4-metilumbelliferil-2-acetamido-2-desoxi-beta-D-glucopiranosido como sustrato (Fig. 23):

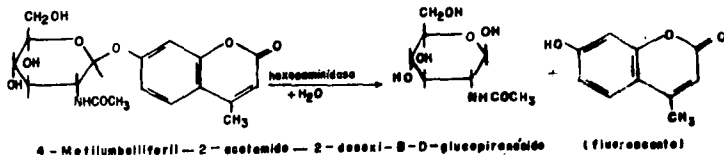


Fig. 23. Sustrato fluorogénico artificial para el diagnóstico de la E.T.S.

En el cerebro la actividad de hex B en la E.T.S. se incrementa casi 10 veces el valor normal, debido a la estimulación lisosomal secundaria para el al-

macén de gangliósidos; después la actividad de otras hidrolasas lisosomales son también incrementadas, pero la actividad de la hex B no se incrementa en tejidos donde el almacén de gangliósidos es mínimo. La deficiencia de hex A persiste en fibroblastos de piel cultivados durante muchas generaciones, así como en suero fetal de la E.T.S., y el ensayo puede hacerse usando suero de cordón umbilical al nacer; esto es especialmente útil con enfermos T.S. que no tienen mancha rojo-cereza en el ojo [78, 79].

2.4 LEUCODISTROFIA METACROMÁTICA. (SULFATIDOSIS)

2.4.1 HISTORIA.

La tinción metacromática del sistema nervioso de un paciente con esclerosis difusa fué reportada por Alzheimer en 1910. En 1921, Witte reportó un paciente similar con una acumulación de material metacromático en la pituitaria, hígado, riñón y testículo. La descripción detallada de una leucodistrofia progresiva familiar en un niño fué hecha por Scholz en 1925. Un significativo avance bioquímico fué hecho en 1958 cuando Jetzkewitz y Austin independientemente reportaron gran exceso de sulfátidos en tejidos de pacientes con leucodistrofia metacromática. La acumulación de este lípido ácido causa la metacromasia característica de la enfermedad. Estas observaciones han sido confirmadas, y esto parece ahora apropiado para referirse a esta condición como lipidosis de sulfátidos. Desde entonces, los conocimientos acerca de la enfermedad Leucodistrofia Metacromática (E.L.M.), se ha incrementado rápidamente [97].

2.4.2 DEFINICION.

La deficiencia de arilsulfatasa A (denominada también sulfatasa), es la base de la Leucodistrofia Metacromática (L.M.), una enfermedad por depósito de lípidos. La enzima recibe este nombre ya que su actividad catalítica se valora generalmente empleando como sustrato ésteres del arilsulfa-

to. Existe pérdida de mielina en nervios periféricos y SNC. Los tipos de E.L.M. asociada con deficiencia específica de arilsulfatasa A son más comunes, y están subdivididos de la siguiente manera: [97]

- Forma Infantil Tardía
- Forma Juvenil
- Forma Adulta.

2.4.3 PATOFISIOLOGIA.

Sulfolípidos.

Este término es aplicado a todos los lípidos que contienen azufre. La Fig. 24 muestra la estructura de la mayoría de éstos encontrados en tejidos de mamíferos, y en todos estos lípidos el azufre existe en forma de sulfato.

Los sulfolípidos existentes se dividen en 3 clases de compuestos:

1) Esfingolípidos sulfatados:

galactosil-sulfátido y lactosil-sulfátido;

son los mayores en el sistema nervioso, y son de gran importancia en la L.M..- En estos compuestos el sulfato está siempre enlazado a la galactosa media del esfingolípidio.

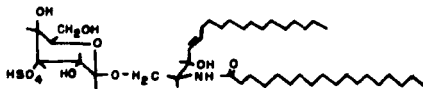
2) Sulfatos Esteroides:

son de particular importancia en la glándula adrenal, testículos y placenta; están normalmente presentes en el plasma, eritrocitos y el cerebro. En muchos pacientes con L.M. su metabolismo no está afectado, pero algunos de los sulfatos esteroides se acumulan, refiriéndose a una deficiencia múltiple de sulfatasa.

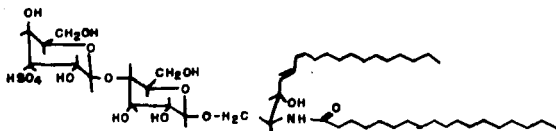
3) El azufre ha sido encontrado en ciertos glicerolípidos conteniendo galactosa. Normalmente estas sustancias están presentes en pequeñas concentraciones en el sistema nervioso y en testículos después de la pubertad. El catabolismo de estas sustancias está también dañado en la L.M., [58].

Galactosil y Lactosil-sulfátidos, son el producto de una serie de reacciones, pero el orden predominante de adición de varios compuestos (acil-galactosil sulfato) hacia la gran base de esfingosina in vivo no es todavía encontrado, ni es sabido si la misma secuencia de reacciones existen en todos los organismos. Sin embargo, varias reacciones alternativas se dan en la Fig. 25, cada una de estas han sido demostradas in vitro en vertebrados, usualmente mamíferos.

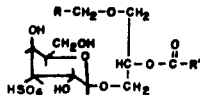
ros y algunas enzimas han sido parcialmente purificadas y caracterizadas [108].



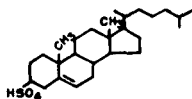
Galactosil-sulfátido; Sulfato-cerebrósido; Galactosil-3-sulfatoceramida.



Lactosil-sulfátido; Galactosil-3-sulfato-glucosilceramida.



Sulfogalactoglicerolípido; Sulfoglicerogalactolípido; Seminolípido.



Colesteril-sulfato.

Fig. 24. Estructura de algunos Sulfátidos.

La asociación de la acumulación de sulfolípidos y la deficiente actividad de arilsulfatasa A (ASA) en la L.N., llevó a la conclusión de que el sulfátido es el mayor sustrato fisiológico de esta enzima. Sin embargo, se ha encontrado que existe la deficiencia de otras sulfatasas, algunas de estas difieren mucho con respecto a su solubilidad, localización subcelular y especificidad de sustrato. Diversos estudios descubrieron dos tipos de sulfatasas en mamíferos, las cuales utilizan arilsulfatos como sustratos, designadas como

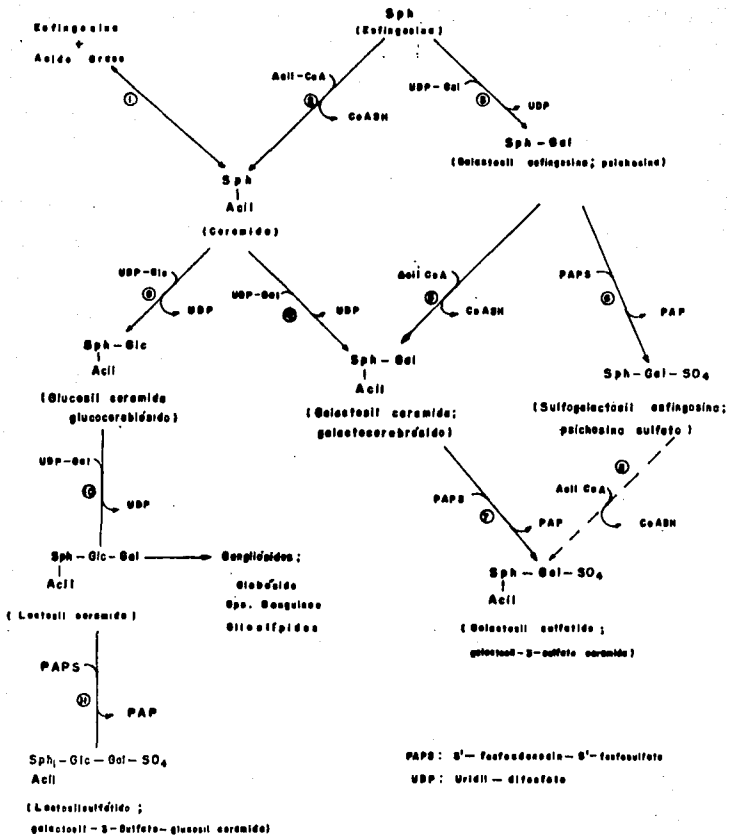


Fig. 25. Biosíntesis de Sulfolípidos.

arilsulfatasa C (ASC), [7].

La Tabla 5 resume algunas de las características de arilsulfatasa A, B y C, e indica los sustratos naturales conocidos:

| ENZIMA | pH OPTIMO | SUSTRATOS NATURALES |
|---------------------------------|-----------|--------------------------------|
| Arilsulfatasa A (mitosomal) | 4.5-5.3 | Galactosil-sulfatido |
| | 4.8 | Lactosil-sulfatido |
| | 4.5 | Sulfogalactosil-esfingosina |
| | 4.5-4.6 | Sulfogalactoglicerolípido |
| | 4.0-4.5 | Acido ascórbico-2-sulfato |
| Arilsulfatasa B (mitosomal) | 3.5 | UDP-N-Ac-gal-4-sulfato |
| | 4.8 | bermistan sulfato |
| | 4.0 | Condroitin-4-sulfato |
| Arilsulfatasa C (microsomal) | 6.2-7.5 | Dehidroepiandrosterona-sulfato |
| | 7.0 | Pregnenolona sulfato |
| | 6.8 | Androstenodiol-3-sulfato |
| | 6.6-8.0 | Estrona-sulfato |
| | 7.4 | Colecteril-sulfato |

Tabla 5. Características de arilsulfatasas humanas.

Las concentraciones más grandes se localizan en riñón, hígado, páncreas, bazo, corazón y pulmones contienen entre 1/5 y 1/10 del nivel encontrado en riñón. Los leucocitos humanos, fibroblastos de piel y el suero también contienen ASA. Existe una estrecha interrelación entre las sulfatasas esteroideas y el grupo de enzimas con ASC; quedando indicado por el hecho de que no sólo hay deficiencias de ASA y ASB; sino también de ASC, responsable de la hidrólisis de algunas sustancias (ver Tabla 5), en problemas de sulfolipidosis [97].

En la L.M., el daño más severo ocurre en la materia blanca del SNC, aunque también se encuentra involucrado el sistema nervioso periférico, ciertos grupos de neuronas y órganos viscerales. Los exámenes muestran que la materia blanca de enfermos está más firme que la normal, tiene coloración gris o algunas veces café, y las regiones severamente afectadas pueden presentar cavidades además tiene pérdida de la cubierta de mielina, un disminuido número de oligodendrocitos, y una gran acumulación de masas granulares esféricas de material lipídico midiendo de 15 a 20 micrómetros de diámetro. Estas masas pueden contener macrófagos, los cuales son prominentes en espacios perivasculares, o

pueden estar libres dentro de tejidos. Los gránulos e inclusiones son llamativamente metacromáticos, y esta característica es responsable del nombre asignado a este desorden [64].

Los cambios en los nervios periféricos son similares a aquellos dentro de la materia blanca centra, y esto ha permitido el uso de biopsias de nervio periférico para diagnóstico. Varios grados de desmielinización son observados, acompañados de una acumulación de gránulos metacromáticos dentro de las células de Schwann y fagocitos. Se ha reportado que la lesión del nervio periférico en la L.N. es una desmielinización segmentada, el término "segmentado" se refiere a la porción de vaina de mielina (y axón) situados dentro de dos nodos - contiguos; cada segmento de mielina está situado dentro del citoplasma de una célula de Schwann; ésta última contiene inclusiones metacromáticas, las cuales son producto del metabolismo de la célula, no fragmentos de mielina rota [5].

En los órganos viscerales involucrados, se observa que el material metacromático está presente en el citoplasma de la célula epitelial en los túbulos del riñón; en las asas de Henle y en los túbulos colectores, pero no en el glomérulo. En ningún paciente ha habido evidencia de daño en la función renal. Un moderado número de gránulos metacromáticos son vistos en histiocitos en la región portal, en las células epiteliales de ductos intrahepáticos biliares y menos frecuentes en las células de Kupffer y parenquimales, particularmente aquéllas de las zonas periféricas de el lóbulo. La acumulación del material metacromático en los testículos se ha reportado sólo en pacientes adultos, especulándose que el lípido metacromático es un seminolípido, en vez de un sulfátido; pues el catabolismo del seminolípido está dañado en la L.N., éste es formado en los testículos después de la pubertad. En el SNC, las inclusiones son más prominentes dentro del citoplasma de oligodendrocitos y astrocitos. Casi todas las inclusiones están rodadas por una membrana unitaria, la cual incluye la actividad de la fosfatasa ácida. Notando dos tipos de inclusiones oligodendrogliales; el primero es pequeño, redondo, laminado concéntricamente con medida de 58 Å. El segundo tipo desplegado perpendicularmente con medida de 100 Å. El primer tipo de inclusión es también observado en otras lipidosis, mientras que el segundo se presenta sólo en tejidos de enfermos con L.N., y llega a ser pronunciado en la enfermedad avanzada. Por otro lado, en la forma infantil tardía de la L.N., los niveles de sulfátidos en la materia blanca son de 3 a 10 veces más de lo normal. Los niveles de cerebrósidos están disminuídos, variando entre menos del 10 y 50% de lo normal. Como resultado, la proporción de cerebrósidos a --

sulfátidos provoca más anormalidades en tejidos con L.M. [97].

En el Adulto con L.M. las anormalidades químicas en la materia blanca son menos severas que en el tipo Infantil. Expresado como un porcentaje de peso seco, el nivel del sulfátido puede estar moderadamente incrementado o disminuído. La proporción cerebrósido/sulfátido ha sido normal en todos los pacientes adultos; esto ha variado entre 0.4 y 1.4, comparado con la proporción normal de 4. La materia gris puede tener niveles incrementados de sulfátidos mucho más elevados que la forma Infantil Trdía. Esto puede relacionarse con la observación de que los tejidos con la Forma Adulta de L.M. pueden mostrar acumulación de lípidos metacromáticos en neuronas corticales, esto usualmente no sucede en la forma Infantil. Lo que también se ha reportado es una disminución de la larga cadena de ácido graso, y de ácidos grasos insaturados que refleja la pérdida de mielina [97].

Por otro lado, los problemas de patogénesis, órganos y tejidos afectados, puede ser dividido en cuatro categorías:

1. Tejidos que muestran poca o ninguna acumulación de sulfátidos y no existe daño en dichos tejidos: corazón, bazo, piel, médula ósea y tracto intestinal.

2. Tejidos en los cuales hay acumulación de sulfátidos, pero no daño demostrable de funciones. Estos tejidos incluyen: hígado y riñón; éste último muestra una acumulación relativamente más grande de sulfátidos que el cerebro, el daño en la función renal no ha sido reportado. Esto indica que la acumulación de sulfátidos no es por sí dañina, al menos para algunas células. Posiblemente la tolerancia del riñón hacia sulfátidos se relaciona con el hecho de que las células epiteliales tubulares más involucradas pueden ser excretadas por la orina. Es posible que todos o la mayoría de los sulfátidos acumulados en el riñón sean producidos en este órgano, antes que hayan sido transportados desde el cerebro, además de que la composición de ácidos grasos (sulfátidos) es diferente.

3. Tejidos en los cuales hay acumulación de sulfátidos y evidencia de daño en la función, pero lo cual no parece contribuir en el desenlace fatal de la enfermedad. Esto se aplica a la vesícula biliar, que muestra acumulación de sulfátidos y daño funcional progresivo. El mecanismo de disfunción es debido a la acumulación masiva de lípidos que podría dañar la contracción, absorción y funciones secretoras de este órgano.

4. Materia blanca del sistema nervioso, la acumulación de sulfátidos y la desmielinización se encuentra en este tejido. La mayor incapacidad de la L.M.

es debida a la desmielinización. Se consideran tres posibles mecanismos para el agotamiento de mielina en la L.M.:

a) La mielina aislada de tejidos procedentes de la L.M. (postmortum), ha sido mostrada por tener una composición anormal; es posible que la mielina de la L.M. sea menos estable que la mielina normal.

b) El agotamiento de la mielina puede ser secundario a los sulfátidos que inducen daño a las células responsables de "mantener la mielina", las células de Schwann en el SNP y los oligodendrocitos en el SNC.

c) El agotamiento de mielina puede ser debido a la acumulación de otro, - como sustancias tóxicas no identificadas todavía [64, 97].

Se plantea que la marcada anormalidad en la proporción cerebrósido/sulfátido demostrada en la L.M., contribuye al agotamiento de la vaina de mielina. Recientemente se ha propuesto que los sulfátidos juegan un papel dentro del transporte de iones sodio. La carga negativa debida a exceso de sulfátidos debería atacar cationes; los resultados sugieren que el incremento en la concentración de cationes daña la estructura y función de mielina. No se sabe si la mielina en la L.M. cuando es formada, muestra el mismo grado de anormalidad que postmortum, o si llega a ser progresivamente más anormal conforme avanza la enfermedad. Se acepta la segunda posibilidad, pues el comienzo de síntomas clínicos casi siempre se desarrolla hasta que el paciente tiene algunos años de edad, sugiriendo que en estos pacientes las funciones de la mielina son normales por un tiempo al menos. La segunda posibilidad de que la composición de la mielina de la L.M. llega a ser progresivamente más anormal en las enfermedades avanzadas, parece ser el principio una variedad normalmente muy lenta o ca si no existe renovación de sulfátidos de mielina. Estudios experimentales indican que hay, aunque muy lenta, renovación de sulfátidos de mielina, e incremento de la misma con el tiempo [76].

Un segundo mecanismo, el cual puede ser el responsable del agotamiento de mielina en la L.M. es el daño progresivo de aquellas células las cuales mantienen la mielina, aunque todavía desconocida su influencia trófica. La vaina de mielina del sistema nervioso consiste de membranas plasmáticas compactas pertenecientes a oligodendrocitos, y una análoga relación existe entre la célula de Schwann y la mielina del nervio periférico. Finalmente se recordará que los nervios periféricos en la L.M., muestran un patrón de desmielinización segmentada; este término se refiere a que el daño en la mielina puede estar presente en zonas con una célula de Schwann particular. Las células de Schwann y oligo-

dendrocitos son conocidos por tener un recambio activo de sulfátidos. La acumulación de éstos dentro de las células en la L.M. sería una consecuencia inmediata de un defecto metabólico. Todavía no se identifica el grado de acumulación de sulfátidos dentro del citoplasma de estas células que pueden entonces interferir con energía de metabolismo, así que las funciones tróficas postuladas para la mielina se mantienen suspendidas [5].

Un tercer posible mecanismo para la degeneración de mielina en la L.M., - es que se debe a la acumulación de un producto tóxico, además de sulfátidos. - Se ha demostrado que en la L.M. hay una deficiencia de la enzima sulfogalactosil esfingosina sulfatasa. Esto puede conducir a la acumulación de sulfogalactosilesfingosina, un compuesto estrechamente relacionado con la galactosil-esfingosina, la cual es conocida por ser altamente citotóxica [32].

2.4.4 SINTOMATOLOGIA CLINICA.

En las sulfatidosis, la característica clínica común es la de producir una afección predominante en la sustancia blanca y el SNP, siendo su semiología superponible a la de las localizaciones normales de los sulfátidos [97].

- Leucodistrofia Metacromática Infantil Tardía.

La edad de comienzo es - más tardía que en la enfermedad de Krabbe o en la E.T.S. Es una enfermedad neurológica progresiva y dolorosa. El desarrollo inicial es casi siempre normal. El curso clínico de esta enfermedad se ha subdividido en 4 estados, los cuales se basan en el grado de incapacidad motora:

Estado Clínico 1. Es cuando la enfermedad llega a ser evidente. Los pacientes tienen debilidad e hipotonía en ambas piernas o de las 4 extremidades. Los reflejos pueden estar disminuidos o ausentes. El niño que ha aprendido a caminar llega a presentar inseguridad y requiere de soporte para permanecer de pie o caminar. En algunos casos los signos del nervio periférico involucrado anteceden clínicamente a la evidente disfunción del SNC. Puede incrementarse el tono muscular pero sin exagerar reflejos. Hasta que el progreso de la enfermedad llega a ser claro, puede diagnosticarse como "parálisis cerebral". La ataxia está presente en algunos casos pero es pequeña y no fácilmente reconocida. La duración de este estado es de 15 meses .

Estado Clínico 2. El paciente puede sentarse pero no estar mucho tiempo

de pie; la regresión es obvia, deterioro en el habla; la hipotonía es reemplazada por hipertonia, particularmente en las piernas. La ataxia es ahora muy evidente. Los reflejos continúan disminuyendo o están ausentes. Dolor intermitente en brazos y piernas es una característica frecuente. Este estado puede ser de corta duración, en algunos pacientes es de algunos días, lo más común es de 3 a 6 meses.

Estado Clínico 3. El niño está en cama y cuadripléjico; el tono muscular es variable. Hay dificultad para alimentarse y en mantener la vía aérea debido a una combinación de parálisis bulbar o pseudobulbar. Puede tener atrofia óptica. La deficiencia mental es mucho más severa; pero estos niños pueden to avía ser capaces de sonreír y hablar. Los reflejos están casi ausentes. Este estado permanece de 3 meses hasta 3 1/2 años.

Estado Clínico 4. Es el estado final del paciente que pierde todo contac to con su medio ambiente; está ciego, sin movimientos voluntarios y sin apetito. Puede alimentarse a través de sondas. Este estado final (vegetativo) pue de permanecer largo tiempo, desde 7 meses hasta 17 años [43, 97].

- Leucodistrofia Metacromática Juvenil.

Existe un considerable número de casos con comienzo entre edad de 3 a 21 años; y se puede dar una descripción clínica clara, pero no permite confundirla con algún estado de la enfermedad Infantil o Adulta. El progreso de las manifestaciones clínicas es intermedio entre la forma Infantil (donde los síntomas iniciales están en la esfera motora) y en la forma Adulta (donde las anomalías iniciales están en la esfera intelectual y motora). Los síntomas pueden ser: fallas en la escuela, disturbios emocionales o desórdenes al caminar. Signos de disfunción extrapiramidal, tales como anomalías posturales o tono muscular incrementado; son más comu nes que en la forma Infantil. Nistagmus e intención de temblor ocurren fre- cuente mente [43].

- Leucodistrofia Metacromática Adulta.

Las manifestaciones clínicas aparecen hasta después de los 21 años. Aunque la edad en que aparecen los síntomas iniciales varía entre 19 y 46 años. Pruebas de memoria y función intelectual muestran signos de demencia; existen signos de disfunción motora, que incluyen lentitud general en los movimientos, habla imprecisa. Reflejos hiperag

tivos y el tono muscular está incrementado siempre y cuando la velocidad de conducción de nervios periféricos esté disminuida, e indica que en esta forma de la enfermedad las manifestaciones del sistema piramidal o extrapiramidal exce-den aquéllas debidas a nervios periféricos involucrados. Los cambios patológicos en nervios periféricos son parecidos a los de la forma Infantil. Moderado nistagmus, ataxia truncal, e intención de temblores, pueden estar presentes. - Pueden ocurrir ataques durante estados tardíos de la enfermedad; en el estado - final el paciente está severamente deteriorado, incontinente, mudo y ataques generalizados. Se dice que la velocidad de conducción disminuida en los nervios periféricos representa una importante guía, pues en muchos desórdenes de demencia o en esclerosis múltiple, los nervios periféricos no tienen su función afectada. Los diagnósticos premortem incluyen demencia, esquizofrenia y esclerosis múltiple; solamente en una minoría de casos se ha hecho el diagnóstico - correcto antes de la muerte [16, 33, 97, 109].

2.4.5 INCIDENCIA.

La incidencia de la forma Infantil Tardía ha sido estimada en proporción de 1:40,000 en Suecos. La forma Juvenil ocurre en casi la cuarta parte de la proporción anterior. La incidencia de la forma Adulta no ha sido determinada, pero parece ser una forma más rara. Los pacientes con L.M. han sido reportados de: Dinamarca, Inglaterra, Francia, Alemania, Hungría, Japón, Noruega, Rusia, España, Suecia, Yugoslavia; y una variedad con antecedentes familiares en Estados Unidos [97].

2.4.6 PRONOSTICO.

La enfermedad sigue un curso de deterioro neurológico progresivo conduciendo a la muerte entre 1 y 4 años. Algunos casos pueden comenzar después de la niñez, prolongándose su curso por varios años [4, 87, 97].

2.4.7 DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de la L.M. se establece poniendo de manifiesto la presencia de concentraciones elevadas de sulfátidos en la orina de pacientes; se ha descrito una disminución de la actividad ASA en la orina de algunos pacientes. En algunos casos se practica una apendicectomía diagnóstica para determinar la existencia de gránulos metacromáticos en los nervios que inervan el apéndice. Un método de diagnóstico mucho más simple consiste en la

determinación de la actividad ASA en leucocitos circulantes [86].

La actividad de la fosfatasa ácida puede estar incrementada. El diagnóstico enzimático se realiza por medio de sustratos artificiales: pNCS (paranitrotrocatecol sulfato) (Fig. 26) o 4-MUS (4-metilumbelliferil sulfato); estos sustratos son atacados por ambas arilsulfatasas A y B, sólo que la primera enzima se encuentra deficiente en pacientes con L.M., para resolver este problema se tiene que el pH óptimo de ASA es aproximadamente 5 y que para ASB es 6; por lo que solamente 2% de la actividad a pH 5 se atribuye a ASB; debiendo enfatizar que este ensayo fué designado solamente para usarse con orina [97].

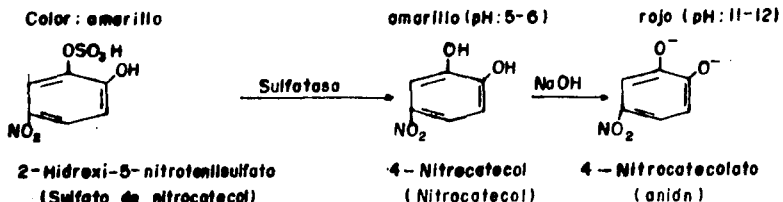


Fig. 26. Sustrato cromogénico artificial para el diagnóstico de la L.M.

En adición al ensayo enzimático, se debe considerar que los tejidos y fluidos son más apropiados para el diagnóstico enzimático de la L.M. Los ensayos iniciales fueron aplicados a la orina debido a las sulfatasas; entre otras enzimas, encontrándose en cantidades detectables en este fluido, surgiendo de células de recambio o que migran dentro del tracto urinario. Los ensayos enzimáticos actualmente se realizan en leucocitos de sangre periférica o en cultivos de fibroblastos de piel. La L.M., también se diagnostica midiendo la actividad ASA en suero, esto tiene la ventaja de reducir tiempo y costo del ensayo enzimático, y facilita gradualmente el desarrollo a gran escala del método [6].

Los sulfátidos presentan tinción metacromática (pardo dorada) con violeta de cresilo al 1% (método de Hirsch-Peiffer). En vista de su contenido de hexosas, los sulfátidos dan además una reacción positiva con la tinción de PAS [62, 104].

2.5 ENFERMEDAD DE FABRY.

2.5.1 HISTORIA.

En 1898, Anderson, en Inglaterra, y Fabry en Alemania, independientemente describieron a pacientes con angiokeratoma corporis diffusum. - Anderson designó a su caso como un angiokeratoma. Fabry originalmente hace un diagnóstico de púrpura nodularia, pero subsecuentemente designó el nombre de - angiokeratoma corporis diffusum. El paciente original de Anderson tuvo proteínuria, deformidad de dedos, venas varicosas y edema en las piernas. Debido a la proteínuria, Anderson sospechó que la enfermedad sería un desorden generalizado y sugirió que los vasos anormales estarían presentes en riñones, así como en piel [97].

2.5.2 DEFINICION.

Esta enfermedad se debe a una acumulación de lípidos, producida por depósito de ceramida-trihexóido (galactosil-galactosil-glucosil-ceramida) en diversos tejidos, en especial el riñón; lo anterior es debido a la deficiencia de alfa-galactosidasa A, [4, 23].

2.5.3 PATOFISIOLOGIA.

La deficiencia de actividad alfa-galactosidasa A en pacientes con enfermedad de Fabry (E.F.), conduce a una acumulación progresiva - de glicolípidos con residuos alfa-galactosil terminal en muchos tejidos no neuronales y fluidos del cuerpo. Estas sustancias están estructural y metabólicamente relacionadas con la familia de compuestos "glicoesfingolípidos", que son de tipo neutro y se clasifican en algunas familias que se muestran en la Tabla 6, en base a la naturaleza de carbohidratos unidos y en la forma en que ellos se enlazan a otros. Además están extensamente distribuidos en tejidos de mamíferos como constituyentes normales de membranas plasmáticas y subcelulares. - Los miembros de la familia globo están predominantemente en tejido no neuronal, en contraste con los gangliósidos, que prevalecen en el SNC. El globósido (glicotetraosilceramida) es el mayor glicoesfingolípidos neutro en el riñón normal y eritrocitos, mientras que lactosil-ceramida es el mayor componente en leucocitos, plaquetas, hígado, bazo y otros tejidos. En el plasma, Glu-Cer es el principal componente, pero todos los 4 lípidos de la familia "globo", están presentés, distribuidos en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), [102, 103].

| FAMILIA | ESTRUCTURA QUIMICA | NOMENCLATURA |
|----------|---|---|
| Globo | $\text{Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | Glucosilceramida |
| | $\text{Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | Lactosilceramida |
| | $\text{Gal } \alpha_1 \rightarrow 4 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | Globotriosilceramida |
| | $\text{Gal NAc } \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } \alpha_1 \rightarrow 4 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | Globotetraosilceramida |
| Gala | $\text{Gal } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | Galactosilceramida |
| | $\text{Gal } \alpha_1 \rightarrow 4 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | Galabiosilceramida |
| Ganglio | $\text{Gal NAc } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | Gangliotriosilceramida |
| | $\text{Gal } \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal NAc } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | Gangliotetraosilceramida |
| Lacto | $\text{Gal } \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Glu NAc } (4 \rightarrow 1 \alpha \text{ Fuc}) \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | $\text{III}^{\text{A}} - \alpha - \text{Fucosil} - \text{Isotetraosilceramida}$ |
| | $\text{Gal } \alpha_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } (2 \rightarrow 1 \alpha \text{ Fuc}) \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Glu NAc } \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | $\text{IX}^{\text{B}} - \alpha - \text{Fucosil} - \text{IX}^{\text{B}} - \alpha - \text{Galactosil} - \text{Lactotetraosilceramida}$ |
| Lactoneo | $\text{Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu NAc } \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | Lactoneotetraosilceramida |
| | $\text{Gal } \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu NAc } \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | $\text{IX}^{\text{B}} - \beta - \text{Galactosil} - \text{lactoneotetraosilceramida}$ |
| | $\text{Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu NAc } (3 \rightarrow 1 \alpha \text{ Fuc}) \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | $\text{III}^{\text{B}} - \alpha - \text{Fucosil} - \text{lactoneotetraosilceramida}$ |
| | $\text{Fuc } \alpha_1 \rightarrow 2 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu NAc } \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | $\text{IX}^{\text{B}} - \alpha - \text{Fucosil} - \text{lactoneotetraosilceramida}$ |
| | $\text{Gal } \alpha_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } (2 \rightarrow 1 \alpha \text{ Fuc}) \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu NAc } \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | $\text{IX}^{\text{B}} - \alpha - \text{Fucosil} - \text{IX}^{\text{B}} - \alpha - \text{Galactosilceramida}$ |
| | $\text{Gal NAc } \alpha_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } (2 \rightarrow 1 \alpha \text{ Fuc}) \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu NAc } \beta_1 \rightarrow 3 \text{ Gal } \beta_1 \rightarrow 4 \text{ Glu } \beta_1 \rightarrow \text{1' Cer}$ | $\text{IX}^{\text{B}} - \alpha - \text{Fucosil} - \text{IX}^{\text{B}} - \alpha - \text{N-acetilgalactosamil} - \text{lactoneotetraosilceramida}$ |

Tabla 6. Glicoesfingolípidos Neutros de origen humano.

En el SNC, Gal-Cer es el mayor glicoesfingolípidos neutro; está asociado con mielina, pero también se ha encontrado en microsomas, fragmentos axonales y neuronas. Pequeñas cantidades de gangliotriosilceramida han sido obtenidos a partir de cerebro humano normal, ellos están asociados con enfermedad por almacenamiento de gangliosidos [102].

Lactoneotriosilceramida es el mayor componente de eritrocitos. Es el

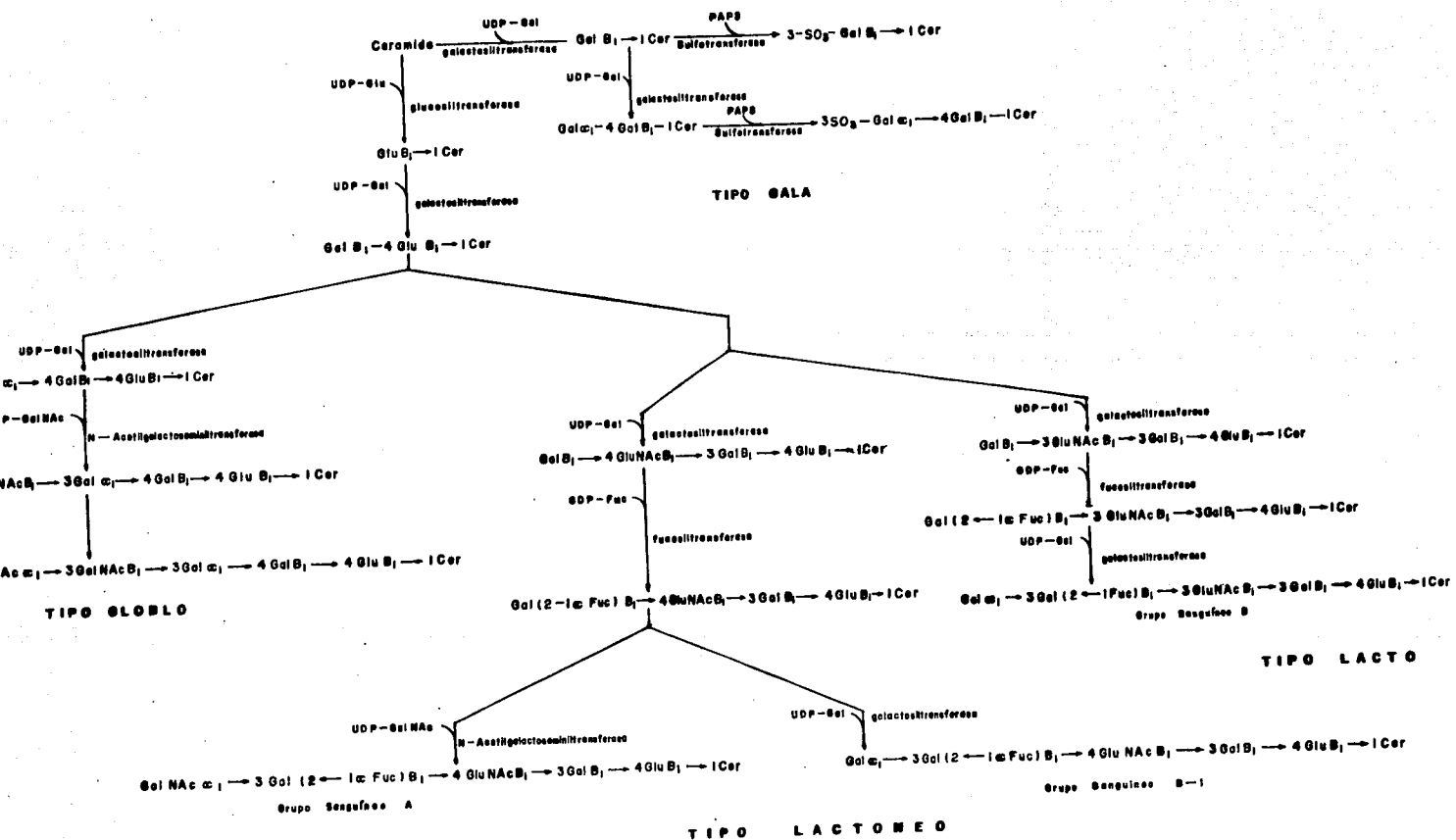
miembro de más bajo peso molecular de los grupos "lacto" y "lactoneo" con una diferencia estructural entre familias "globo" y "ganglio"; parece ser el precursor metabólico de glicosfingolípidos A, y B. El compuesto que sigue en más alto peso molecular es el lactoneotetraosilceramida (paraglobósido), el cual es un constituyente de eritrocitos, está en bajas concentraciones en leucocitos, bazo, músculo y nervios periféricos. En general, tejidos epiteliales glandulares tales como estómago, páncreas e intestino, son una rica fuente de estos esfingolípidos. Los glicosfingolípidos neutrales son sintetizados por reacciones enzimáticas secuenciales. Involucrando la adición de unidades monosacáridas hacia aceptores, los cuales son de precursores apropiados para cada enzima (Fig. 27): [97].

Los glicosfingolípidos son degradados por exo-glicosidasas específicas (Fig. 28), las cuales son glicoproteínas con pH ácido (óptimo); ellas existen predominante pero no exclusivamente en lisosomas. Morfológicamente, la E.F. es caracterizada por depósitos de glicosfingolípidos cristalinos muy extensos en tejidos, los cuales muestran birrefringencia. El glicolípidos está depositado en todas las áreas del cuerpo, predominando en lisosomas del endotelio, y células del músculo liso de vasos sanguíneos; en un menor grado de células reticulares e histiocíticas en tejido conectivo. Los depósitos lipídicos son también sobresalientes en células epiteliales de córnea, glomérulo y túbulo del riñón, músculo fibroso del corazón y en células ganglionares del SNA, [59].

Individuos cuyo grupo sanguíneo es tipo B parecen estar más severamente afectados, debido a la acumulación adicional de glicosfingolípidos B-específicos. La variación de la cantidad de esfingolípidos depositados en individuos afectados puede también resultar de la actividad alfa-galactosidasa A residual. El origen de los sustratos glicosfingolípidos acumulados no ha sido completamente clarificado. Hay una contribución significativa de la síntesis endógena y acumulación lisosomal subsecuente de alfa-galactosil terminal conteniendo glicosfingolípidos, siguiendo la autofagia de material membranoso celular con teniendo estos sustratos lipídicos [51].

La única distribución celular y en tejido de Gal-Gal-Glu-Cer acumulada, particularmente en el epitelio vascular, sugiere que una significativa contribución intracelular puede ser derivada de la endocitosis o difusión de Gal-Gal-Glu-Cer desde la circulación donde las concentraciones son de 3 a 10 veces más altas que en individuos normales. Sin embargo, el origen de la Gal-Gal-Glu-Cer circulante no es conocido, hay al menos dos mecanismos que pueden ser postula-

Fig. 27. Pasos en la biosíntesis de glicoesfingolípidos neutros a partir de Ceramida.



TIPO LACTONEO



-Gal α -galactosidasa



-Fuc α -L-fucosidasa



-Gal β -galactosidasa

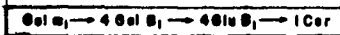


-GluNAc
 β -N-Acetilhexosaminidasa

TIPO GLOBO



-GalNAc β -N-acetilhexosaminidasa



-Gal α -galactosidasa



β -galactosidasa



-Glu β -glucosidasa

Ceramida

TIPO GALA



-Gal α -galactosidasa



β -galactosidasa
-Gal

Fig. 28. Catabolismo de Glicosfingolípidos Neutros.

dos para explicar las concentraciones incrementadas en plasma:

- Pueden ser "excretadas" dentro de la circulación a partir de lisosomas secundarios de varios tipos de células de todo el cuerpo, puesto que el glicoesfingolípido no puede ser catabolizado en la circulación, éste debería acumularse lentamente, reflejando una clase dinámica de recambio de varias células, la contribución de la exocitosis y el tipo de captación dentro del endotelio vascular por endocitosis, captación de lipoproteína o difusión .

- Alternativamente, se ha postulado que el globósido eritrocítico (GalNAc-Gal-Gal-Glu-Cer), que es el glicoesfingolípido precursor de Gal-Gal-Glu-Cer, puede ser el mayor origen metabólico del lípido patogénico circulando.

El "globósido" es liberado dentro de la circulación a partir de eritrocitos que envejecen, y subsecuentemente catabolizado en alguna parte hasta alfa-galactosidasa A conduciendo a un nivel incrementado de Gal-Gal-Glu-Cer (en el plasma), el cual es primeramente transportado en fracciones de lipoproteínas LDL y HDL; en proporciones normales a las del plasma normal. Entonces la Gal-Gal-Glu-Cer circulando probablemente gana acceso hacia células vasculares endoteliales por un receptor que media la captación, así como hacia células contiguas epiteliales y de músculo liso de vasos sanguíneos de todo el cuerpo, y hacia las células endoteliales y epiteliales contiguas a los glomérulos; sitios que están involucrando áreas más extensivas de depósito de glicoesfingolípidos [59].

Los depósitos en otros tejidos pueden ser también derivados de una extensión menor a partir de una difusión de globósido o Gal-Gal-Glu-Cer desde el plasma y fluido intersticial. Los lisosomas de todas las células están deficientes en la actividad de alfa-galactosidasa necesaria para degradar glicoesfingolípidos de el tipo "globósido", la Gal-Gal-Glu-Cer intermedia se acumula y es almacenada dentro de cuerpos multivasculares extendidos o, en grados más avanzados, como masas intracitoplasmáticas libres las cuales pueden conducir a disfunción o degeneración celular. El metabolismo de al menos otros 2 compuestos es también anormal, demostrándose por la acumulación de digalactosilceramida (Gal-Gal-Cer), y de sustratos antigénicos del grupo sanguíneo B. Aunque la cantidad total de glicoesfingolípidos almacenados en un tejido dado depende del tiempo, la velocidad de acumulación de origen intracelular y circulatorio, las posibilidades para excreción, y los tipos individuales A, B, O [51].

El modelo de acumulación de glicoesfingolípidos, predominantemente en el sistema cardiovascular-renal, está patológicamente relacionado con las mayores

manifestaciones clínicas de la enfermedad. La dilatación, disminución motora e inestabilidad de los vasos sanguíneos son las mayores características de los cambios fisiológicos de la enfermedad. Células endoteliales hinchadas, frecuentemente acompañadas por proliferación endotelial, invadiendo el lumen con un incremento focal de presión intraluminal e isquemia periférica o infarto. Tales cambios son frecuentemente los precursores de trombosis e infartos del cerebro y otros tejidos. La isquemia de músculo y nervio periférico puede contribuir a dolor o fatiga. Las alteraciones observadas del control vasomotor pueden reflejar las lesiones vasculares o los extensos depósitos glicoesfingolipídicos en células ganglionares autónomas y de cubierta perineural. La alteración de la respuesta vasomotora ha demostrado vasoconstricción dañada. La lesión vascular combinada con lesión neural explica la intolerancia a la temperatura [103].

Las células nerviosas periféricas y centrales involucradas pueden ser las responsables de la parestesia, dolor, hipohidrosis; tales como síntomas gastrointestinales: náuseas y diarrea, y una variedad de signos y síntomas neurológicos del vago. Las fiebres episódicas pueden estar relacionadas con lesiones del hipotálamo. Las observaciones de un decremento selectivo en el número de fibras no mielinizadas y poco mielinizadas en nervios periféricos, sugiere que el daño selectivo hacia las fibras puede ocurrir por la acroparestesia y producción de dolor [35].

Los desórdenes observados en la función renal tienen sus bases en las lesiones de nefronas y vasos renales, y posiblemente en desórdenes de pituitaria posterior e hipotálamo. Depósitos de glicoesfingolípidos anticipan signos y síntomas clínicos. Durante el período temprano, las lesiones de la vascularización renal son menores que las de la nefrona, la estructura renal se mantiene. Se observa ligera proteinuria y puede explicarse por la alteración de las células epiteliales glomerulares y sus procesos, o por descamación incrementada de las células epiteliales tubulares cargadas de lípidos. La pérdida de capacidad de concentración renal, con poliuria y polidipsia, puede ocurrir al avanzar significativamente el decremento de la filtración glomerular o evidencia de falla renal. El síndrome de diabetes insípida, no está relacionado por falta de transferencia de electrolitos en túbulos distales, pero puede resultar de la insensibilidad para la hormona antidiurética o la disfunción combinada de las células renales y lesiones de los núcleos supraópticos (cargados con glicoesfingolípidos), un centro antidiurético del hipotálamo. Los cambios tardíos y más severos son el resultado de lesiones vasculares y de hipertensión [103].

El depósito progresivo de glicoesfingolípidos en células del miocardio, en fibroblastos valvulares y en los vasos coronarios, es la primera causa de la enfermedad cardíaca. La frecuente hipertrofia del ventrículo izquierdo e insuficiencia mitral (válvula), están probablemente relacionadas por el hecho de que el miocardio ventricular izquierdo y la válvula mitral son los sitios de más marcado depósito de Gal-Gal-Glu-Cer en arterias coronarias conduce a isquemia miocárdica e infarto. Los síntomas pulmonares han sido atribuidos a la vascularización pulmonar o bronquial involucrada, y la glándula de la mucosa epitelial. El linfadenoma probablemente resulta de la obstrucción linfática o insuficiencia venosa secundaria por células endoteliales cargadas de lípidos. Reportes de crecimiento retardado, pubertad retrasada, barba anormal o fertilidad dañada, asociada con un decremento de gonadotropinas, puede relacionarse con observaciones de atrofia testicular o con almacenamiento de glicoesfingolípidos en el lóbulo anterior y posterior de la glándula pituitaria o en las células intersticiales de los testículos [48, 94, 102, 110].

2.5.4 SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA.

Aparecen lesiones cutáneas usualmente en la niñez o alrededor de la pubertad y consisten en aparición de manchas que varían en tamaño, desde escasamente visibles hasta algunos milímetros. Ellas son rojo claro y pueden llegar hasta azul oscuro, algunas están cubiertas con una leve costra. Son lesiones no punsativas. Tienden a agruparse cerca del ombligo, glande, escroto, asentaderas, caderas y muslos; pero ellas pueden aparecer en cualquier parte, incluyendo la mucosa oral. Inicialmente se encuentran algunas lesiones, pero conforme la enfermedad progresa ellas pueden aparecer en abundancia. Lesiones en piel pueden estar ausentes. La transportación está en ocasiones disminuída. El pelo puede ser escaso; parestesia en pies y manos, y episodios de muy severo dolor con ardor en las extremidades, acompañado por fiebre, pueden ser los síntomas tempranos que son acelerados por exposición al calor o frío, o por esfuerzo físico, náuseas, diarrea y dolor abdominal son comunes, así como dolor en músculos y articulaciones. Los pacientes pueden quejarse de vértigo, debilidad y dolor de cabeza. El edema puede ocurrir en la folla renal o cardíaca. Venillas torcidas pueden encontrarse en la conjuntiva y retina. Opacidad corneal es usual, así como también en el cristalino se puede encontrar. Hipertensión se puede desarrollar en personas de edad avanzada, y puede ser la evidencia de infarto al miocardio, falla congestiva o enfermedad

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

cerebrovascular. Se presenta albuminuria; células "mora" conteniendo glicoesfingolípidos pueden encontrarse en sedimento urinario; hematuria; baja gravedad específica estable; azotemia y anemia [4, 97].

2.5.5 INCIDENCIA.

La enfermedad no es común; al parecer no existe predisposición racial. La alteración metabólica se hereda de forma ligada al sexo. Apareciendo los daños graves en hombres. Las mujeres son portadoras asintomáticas y desarrollan alteraciones leves que se limitan generalmente a alteraciones oculares y dermatológicas [4, 16].

2.5.6 PRONOSTICO.

Frecuentemente la insuficiencia renal produce la muerte, casi siempre entre los 30 y 50 años. El promedio de vida es mayor en las mujeres, aunque raramente pueden presentarse complicaciones mortales [97].

2.5.7 DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de la E.F. se ha realizado en algunas mujeres durante la infancia; las manifestaciones más comunes que aparecen antes de las lesiones son fiebres recurrentes asociadas con dolor en manos y pies, frecuentemente diagnosticadas como fiebre reumática o neurosis. Además se hace un cuidadoso examen oftalmológico, búsqueda de inclusiones birrefringentes en el sedimento urinario, y biopsia de piel o médula ósea. La observación de retina dilatada y distrofia corneal puede ayudar para el diagnóstico. La biopsia de piel revela la característica de doble refracción e inclusiones lipídicas en vasos sanguíneos. Los macrófagos conteniendo lípidos pueden observarse en aspirados de médula ósea [26].

El diagnóstico debe confirmarse bioquímicamente por la demostración de una marcada deficiencia de la actividad alfa-galactosidasa A en leucocitos [26, 50]; biopsias de tejido o fibroblastos de piel cultivados [8, 26, 114]; usando un fluorogénico artificial o alfa-galactopiranosido (Fig. 29) como sustrato. Alternativamente, varios procedimientos de análisis de glicoesfingolípidos pueden estar acompañando a lo anterior para demostrar los niveles incrementados de ceramida trihexósido (Gal-Gal-Glu-Cer) y ceramida dihexósido (Gal-Gal-Cer), en sedimento urinario [47, 63], plasma o fibroblastos de piel cultivados [24].

Aparecen signos renales, principalmente proteinuria y en ocasiones eleva-

dos niveles de colesterol en suero [97].

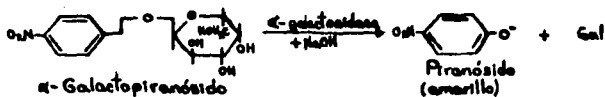


Fig. 29. Sustrato fluorogénico artificial para el diagnóstico de la E.F.

2.6 LEUCODISTROFIA GLOBOIDE CELULAR.

2.6.1 HISTORIA.

En 1916, Krabbe describió la forma clínica e histológica de dos hermanos que murieron de una esclerosis aguda difusa en el cerebro. El no tó que aparecía en forma familiar, con un comienzo temprano de espasticidad, -avanzando rápidamente hacia la muerte. Bullard y Southaid, describieron células gigantes multinucleadas en regiones perivasculares del cerebro de un pacien te que desarrolló una enfermedad aguda progresiva a la edad de 6 años; la muer te sobrevino a los 6 meses del comienzo de la enfermedad. Las características clínicas, así como la distribución de las lesiones en el cerebro no fueron tan típicas como las conocidas actualmente en la enfermedad de Krabbe (E.K.). En 1908, Beneke también había descrito grandes células similares en el cerebro, las cuales mostraron áreas de esclerosis difusa y placas irregulares de dies mielinización. Collier y Greenfiel, fueron los primeros en designar el término globoide para describir las numerosas células anormales en la materia blanca. Sin embargo, ellos llamaron a la enfermedad encefalitis periaxial de Schil der, describiendo las características morfológicas de la Leucodistrofia Globoide Celular. Una gran deficiencia de la galactosil-ceramida-beta-galactosidasa fué demostrada en el cerebro, hígado, bazo y riñón en 1970; esta misma deficiencia fué también encontrada en leucocitos, suero y fibroblastos -cultivados [97, 100].

2.6.2 DEFINICION.

La leucodistrofia Globoide Celular o enfermedad de Krabbe, es una enfermedad metabólica hereditaria del sistema nervioso, en la cual se presenta deficiencia de la enzima galactosil-ceramida-beta-galactosidasa. Es considerada como enfermedad rara [97].

2.6.3 PATOFISIOLOGIA.

Generalidades.

El galactocerebrósido es un cerebrósido del sistema nervioso cuya estructura es (Fig. 30):

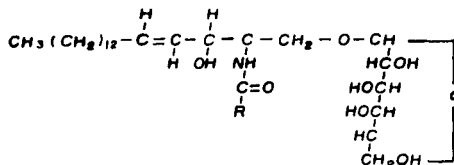


Fig. 30. Estructura de Galactocerebrósido.

Pertenece al grupo de lípidos generalmente llamado esfingoglicolípidos. Dentro de los cuales los galactocerebrósidos y sulfátidos en el cerebro humano de adultos normales, la esfingosina formada por 18 carbonos constituye 95% o más del total de esfingosina. El sulfátido del cerebro es un derivado del galactocerebrósido, tiene un grupo sulfato adicional, un éster enlazado al C-3 de la galactosa. Junto con la galactosilceramida, el sulfátido está también presente en elevadas concentraciones dentro del sistema nervioso. Dos caminos han sido propuestos para la biosíntesis de la galactosilceramida (Fig. 31); los galactocerebrósidos están prácticamente ausentes en órganos sistémicos excepto el riñón, el cual normalmente contiene cantidades apreciables, aunque mucho menores que el cerebro; en donde particularmente la materia blanca es rica en galactocerebrósidos (14.6%) y su éster-sulfato; sulfátido. La materia gris contiene mucho menores cantidades de estos glicolípidos (0.92%). Los galactocerebrósidos se localizan principalmente en la vaina de mielina y probablemente en células oligodendrogliales; pues la vaina de mielina es una extensión es

pecializada de la membrana de la célula oligodendroglial [98].

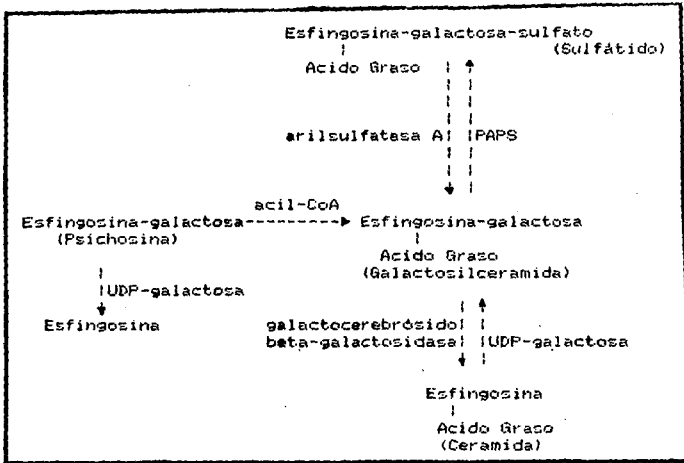


Fig. 31. Biosíntesis de Galactosilceramida, [30, 97].

Pues otro lado se tiene que la cantidad de cerebrósidos y sulfátidos es un indicador bioquímico (muy sensible) de la masa de mielina presente en el cerebro. El incremento en el contenido de cerebrósidos en el cerebro coincide con el activo período de mielinización. La mielina de cerebros adultos generalmente contiene galactocerebrósidos en una concentración de 15-18% de peso seco, la suma de las cantidades de galactocerebrósidos y sulfátidos llega a ser de 20% del peso seco de la mielina. El contenido de galactocerebrósidos de mielina proveniente de nervios periféricos es un poco menor que el de la mielina del SNC. El metabolismo de galactocerebrósidos de cerebro está estrechamente relacionado con el metabolismo de la mielina. El rasgo metabólico más significativo de la mielina del SNC es su elevada velocidad de formación y renovación durante períodos cortos de aguda mielinización y su relativa lentitud en el adulto. El período de activa mielinización en humanos ya desde el período perinatal hasta cerca de los 18 meses de edad; aunque la mielinización no se detiene

después de este período, y en el cerebro humano puede no estar completa hasta la edad de 20 años. La vida media de cerebrósidos y sulfátidos en el cerebro maduro humano es un año o más. La mielina es metabólicamente el componente más estable de las fracciones subcelulares del cerebro [31].

Existen algunos aspectos claves en el metabolismo de galactocerebrósidos los cuales son cruciales en la patofisiología de la E.K.:

- 1) El galactocerebrósido consiste de esfingosina, ácido graso y galactosa.
- 2) El galactocerebrósido es un precursor del sulfátido.
- 3) Ambos: galactocerebrósido y sulfátido están usualmente concentrados en la vaina de mielina.
- 4) El sulfátido es normalmente degradado a galactocerebrósido.
- 5) Una enzima hidrolítica lisosomal, galactocerebrósido-beta-galactosidasa, es la responsable del primer paso en la degradación normal de cerebrósidos, en los cuales los galactocerebrósidos son separados hasta ceramida y galactosa. Algunos galactolípidos relacionados también sirven como sustratos para la misma enzima, incluyendo galactosilesfingosina (psichosina), monogalactosil-diglicérido y lactosilceramida.
- 6) La biosíntesis de galactocerebrósidos alcanza un máximo que coincide con el período de mielinización máxima (durante el primer año y medio en humanos).
- 7) La actividad galactocerebrósido-beta-galactosidasa presente en baja concentración antes de la mielinización, se incrementa severamente durante el período activo de mielinización, cuando la mielina es renovada relativamente rápido.
- 8) Una vez formada, la mielina de adulto es raramente estable metabólicamente, aunque no significa completamente inactiva.
- 9) Los elevados niveles de galactocerebrósido-beta-galactosidasa alcanzados durante la activa mielinización son retenidos en el cerebro adulto [31, 52, 97, 111].

Características morfológicas y bioquímicas.

La explicación a las características morfológicas y bioquímicas de la enfermedad está basada en la deficiencia de la enzima galactosilceramida-beta-galactosidasa. Encontrándose:

- a) Pérdida casi total de mielina y oligodendroglía.
- b) Composición química normal de la mielina restante.
- c) Evidencia morfológica del decremento en la cantidad de mielina durante la enfermedad.
- d) Infiltración masiva por las células globoides.
- e) Ausencia de acumulación en exceso de cerebrósidos en el cerebro a pesar de la obstrucción en la vía de degradación.

Los siguientes pasos podrían ocurrir en el cerebro de pacientes con deficiencia de galactocerebrósido-beta-galactosidasa. Antes de la mielinización no hay cerebrósidos en el cerebro. Por consiguiente, la escasez en la actividad enzimática es una pequeña consecuencia, aunque está presente normalmente en bajas concentraciones. Tan pronto como la mielinización comienza, justo antes del nacimiento en humanos, la mielina nuevamente formada comienza a pasar por un estado de recambio normal; este período coincide con una rápida elevación de la actividad galactocerebrósido-beta-galactosidasa en el cerebro normal. Por otro lado, en el cerebro de pacientes con E.K., los galactocerebrósidos provenientes de la mielina catabolizada no pueden ser degradados debido a la escasez de la enzima; y el cerebrósido no degradado produce infiltración celular. En condiciones experimentales, la célula globoides bajo un exceso de cerebrósidos es digerida, pero las células globoides en la E.K. permanecen, debido a que los galactocerebrósidos no son degradados, puesto que el proceso de mielinización, la mielina total se incrementa y son formados varios galactocerebrósidos libres. La continuidad del proceso provoca aumento de las células globoides, sin embargo, la mielinización no puede seguir indefinidamente; pues el incremento constante de células globoides oprimen a las células oligodendrogliales, las cuales mueren pronto. Cuando el estado de muerte masiva de las células anteriores es muy extenso, ocurre un rompimiento rápido de mielina, puesto que la mielina es una extensión de las membranas celulares, la mielina rota contribuye al aumento de cerebrósidos y esto produce un rápido incremento de las células globoides. Finalmente mueren todas las células oligodendrogliales y la mielina se agota; alcanzándose la máxima infiltración de las células globoides, pero no hay producción de cerebrósidos de la mielina. La cantidad total de cerebrósidos que puede almacenarse en el cerebro durante la corta vida del paciente está limitada por la pequeña cantidad de mielina producida antes de la muerte de todas las células oligodendrogliales, y la total destruc-

ción tiene lugar, en lugar de lo que pudiera haber sido normalmente un estado temprano de la mielinización [65].

La casi exclusiva localización de galactocerebrósidos es mielina y oligodendroglia, y de UDP-galactosaceramida-galactosiltransferasa en esta última, junto con la pérdida casi total de esos componentes neuronales en el estado terminal de la enfermedad, soportan la hipótesis anterior; donde llama la atención esa pérdida casi total de oligodendroglia. Una competencia entre las células globoides y la oligodendroglia es un posible mecanismo, pues el bloqueo en el catabolismo de la galactosilceramida dentro de la oligodendroglia podría ser la causa de su muerte antes que la reacción de la célula globoide [30, 97].

En la E.K., la cantidad de sulfátidos en la materia blanca llegan a ser exclusivos como un resultado de la degradación defectuosa de sulfátidos, pero no hay pérdida masiva de la oligodendroglia y el exceso de la acumulación de sulfátidos ocurre primero dentro de las células oligodendrogliales. Por otro lado, la psychosina es también un sustrato para la galactosilceramida-beta-galactosidasa, y pacientes con E.K., son capaces de degradarla. Aunque se plantea que la psychosina generada dentro de la oligodendroglia durante el período de activa mielinización, puede alcanzar algún nivel tóxico, matando las células. Las células oligodendrogliales son selectivamente destruidas debido a la formación de psychosina que ocurre primeramente en estas células, y cesa el proceso de mielinización. Existe controversia entre saber si la E.K., representa el cese temprano de la mielinización o el rápido rompimiento de la mielina ya formada; y se tiene que ambos procesos están involucrados, y ocurren como resultado de la muerte de la oligodendroglia [52].

La implicación del SNP, es supuesta, pues aquí la mielina también contiene galactocerebrósido. Los histiocitos en nervios periféricos contienen inclusiones anormales similares a las del cerebro, pero no es claro porque ellos no son transformados a las típicas células globoides multinucleadas. La ausencia de células anormales (morfológica y funcionalmente) fuera del sistema nervioso es compatible, debido a que la galactosilceramida está prácticamente ausente en la mayoría de los tejidos no neuronales. La actividad residual de la galactocerebrósido-beta-galactosidasa en algunos casos puede ser suficiente para mantener el recambio normal de pequeñas cantidades de galactocerebrósidos; tal parece ser el caso del riñón. Por otro lado, el incremento de galactocerebrósidos en el hígado, sugiere que la actividad enzimática es inadecuada. Aún en este órgano, las cantidades incrementadas de galactosilceramida son también muy peque

ñas para causar anomalías morfológicas o funcionales [65, 101].

Convencionalmente, la característica de células anormales, presentes en la materia blanca se divide en 2 categorías: células epiteliales (células globoides) y cuerpos globoides. Las células epiteliales son de tamaño medio, casi mononucleares, redondas u ovals. Los cuerpos globoides son grandes, redondas u ovals. Los cuerpos globoides son grandes, irregulares, multinucleados, — diámetro de 20-50 micrómetros, de 15-20 núcleos localizados cerca de la membrana citoplasmática. Aparte del número de núcleos, estas células son identificadas por características coloridas y entre ellas son células que podrían ser — consideradas de transición; pues evidencias experimentales indican que estos 2 tipos de células tienen el mismo origen. Sin embargo, el término de "células globoides" se usará para ambos tipos de células, señalando si es mononuclear o multinuclear cuando sea necesario diferenciar entre ellas. [99].

Además de las células globoides, las áreas con materia blanca previamente ocupada por axones, mielina y células oligodendrogiales están llenos con una densa proliferación de fibras astrocíticas que contienen un gran núcleo pleomorfo. En contraste con la materia blanca destruida, la materia gris está mucho menos afectada y limitada a degeneración focal o laminar ligera en la corteza cerebral; cambios regresivos en neuronas, núcleos dentados en tálamo y otras áreas [97].

Es difícil determinar la secuencia cronológica de varios cambios histológicos, por lo que se ha formulado la evolución cronológica de los cambios morfológicos en base al estudio de múltiples secciones provenientes de 3 pacientes. Utilizando el grado de desmielinización, se divide el curso en 4 estados: (1) reciente, (2) avanzada, (3) tardía y (4) final. Las lesiones recientes se caracterizan por la presencia de materia intra- y extracelular PAS-positivo, — con subsecuente formación de células globoides mononucleares y sólo un pequeño decremento en la intensidad de coloración de la mielina. En el estado avanzado, la mielina y axones están disminuidos y la gliosis astrocítica llega a ser prominente. Las células globoides son más numerosas y tienden a agruparse alrededor de vasos sanguíneos, y muchas llegan a ser multinucleadas. En el estado tardío, las células globoides llegan a ser menos en número y están más agrupadas alrededor de vasos sanguíneos; la mielina y axones están marcadamente — disminuidos. El estado final, es característico de una gliosis astrocítica predominante, con células globoides restantes y pérdida total de mielina y axones [99].

El nivel ultraestructural de las células globoides mono- y multinucleadas parece similar, excepto por el número de núcleos. Ambas contienen numerosos pseudópodos finos, los cuales son característicos de macrófagos; citoplasma granular moderadamente denso conteniendo prominente RER; muchos ribosomas libres; abundantes filamentos finos de aprox. 90-100 Å, e inclusiones citoplasmáticas anormales diseminadas o agrupadas. Las inclusiones tienen moderada densidad, curvas o rectas, y están libremente diseminadas entre los organelos citoplasmáticos normales, pero algunas veces están empaquetadas en el citoplasma, con o sin una membrana externa limitando. Estos túbulos frecuentemente contienen estrías longitudinales de densidad variable, aprox. de 60 Å de ancho. Otro tipo de inclusiones tubulares anormales, presentan entrelazamientos de túbulos de 40-50 Å con estrías longitudinales, y secciones cruzadas rectangulares o irregulares alrededor. Este segundo tipo de túbulo es similar al de la E.G. pero los primeros túbulos más largos muestran ser únicos en la E.K. [97].

En los nervios periféricos los cambios patológicos han sido observados por microscopía de luz, donde las lesiones consisten en cambios degenerativos desde mínimos hasta severos en axones y vainas de mielina; asociados con fibrosis endoneuronal y la acumulación de histiocitos espumosos alrededor de los vasos sanguíneos endoneuronales o trabéculas del endoneurio. La desmielinización segmental es común. Las células globoides típicas no se encuentran en nervios periféricos. Inclusiones tubulares rectas o curvas, similares a las células globoides en el cerebro, se encuentran dispersas y empaquetadas en el citoplasma de histiocitos, o alrededor de vasos sanguíneos [97, 99, 116].

2.6.4 SINTOMATOLOGIA CLINICA.

El comienzo clínico de la enfermedad es entre los 3 y 6 meses después de nacer, pero algunos pacientes muestran anomalías clínicas más pronto. Una paciente mostró rigidez desde el nacimiento, tuvo tendencias a mantener los puños apretados, sus manos y piernas extendidas. -- Otro paciente, tuvo vómito desde la primera semana de vida, presentando malnutrición, siendo hospitalizado a los 2 1/2 meses de edad. Algunos pacientes se desarrollan lentamente en los primeros meses y puede ser que tengan síntomas no detectables. Raramente, la enfermedad llega a ser evidente en la infancia tardía; sin embargo, se han ido incrementando los reportes de la enfermedad en la niñez o en adultos. En todos los casos, el diagnóstico patológico fué hecho en base a las células globoides del SNC. También es claro que la E.K. se defina

como un defecto genético en la actividad de la galactosilceramida-beta-galactosidasa que puede ocurrir en grupos de edad más avanzada [16, 97].

El curso de la enfermedad es regularmente progresivo y ha sido dividido en tres estados:

El Estado 1: se caracteriza por hiperirritabilidad generalizada, episodios febriles de origen desconocido, y poca rigidez de las extremidades. El niño es aparentemente normal los primeros meses de edad, llegando a ser hipersensible a lo que escucha, al tacto o a los estímulos visuales y llega a llorar frecuentemente sin causa aparente. Existe ligero retraso o regresión en el desarrollo psicomotor; vómito, dificultad para alimentarse y ataques convulsivos pueden ocurrir como síntomas clínicos iniciales. El fluido cerebroespinal (CSF) presenta incremento de proteínas.

El Estado 2: se desarrolla rápido y severo deterioro mental y motor. Hay marcada hipertonicidad, piernas extendidas y cruzadas, brazos doblados, espalda encorvada. Los reflejos en tendones son hiperactivos; pequeñas convulsiones ocurren. Atrofia óptica y reacciones papilares lentas hacia la luz.

En Estado 3: es el "estado apagado", alcanzado frecuentemente dentro de algunas semanas o meses. El niño está ciego y no tiene contacto con lo que lo rodea. Puede aparecer sordera; el estado final puede continuar por muchos años aunque algunos pacientes raramente sobreviven por más de 2 años.

El tamaño de la cabeza es normal, pero se ha reportado un paciente con macrocefalia a los 7 1/2 meses de edad. La cabeza permaneció relativamente grande comparada con el peso del cuerpo, con la fontanela anterior grande y abierta a la edad de 12 meses. Los signos y síntomas están limitados casi exclusivamente al sistema nervioso. Las vísceras están ensanchadas; el vómito es algunas veces prominente, resultando en una pérdida progresiva de peso y en pacientes se reportó respiración amoniacañ ajeja, cuyo origen es desconocido. Ataques de hipertermia, los cuales son atribuidos al sistema hipotalámico involucrado, pues también se ha reportado en ausencia de infección [99].

La implicación de los nervios periféricos se consideró como rara en esta enfermedad, en contraste con la L.M. El exámen clínico no siempre revela neuropatía, especialmente en los estados tempranos, debido a que los signos y síntomas del SNC involucrados son dominantes. Algunos autores han reportado reflejos ausentes en tendón o que desaparecen en el curso de la enfermedad. Sin embargo, hay descripción de pacientes con reflejos de tendón normal o hiperactivo; concluyéndose que los reflejos de tendón están usualmente deprimidos des-

pues de los primeros 6 meses [97].

2.6.5 INCIDENCIA.

La Leucodistrofia Globoide Celular es una enfermedad rara que se presenta en ambos sexos. La incidencia entre la población general es desconocida. Se han reportado 32 casos Suecos durante el período: 1953-1967, y calcularon la incidencia como: 1 de cada 50,000 nacimientos, aunque ésta no puede generalizarse, pues la incidencia parece ser más alta en países escandinavos, Alemania, Francia, Italia, Suiza, Países Bajos, Polonia, Rusia, U.S.A., Canadá, Japón e India [97].

2.6.6 PRONOSTICO.

Los pacientes raramente sobreviven después de los dos años de edad [97].

2.6.7. DIAGNOSTICO.

Los ensayos de la glucocerebrósido-beta-galactosidasa en materiales fácilmente disponibles tales como: suero, leucocitos periféricos, o fibroblastos cultivados, ofrecen los mejores y más seguros medios para el diagnóstico de la E.K. Debido a la amplia especificidad de la galactosilceramida-beta-galactosidasa, otros sustratos naturales pueden ser usados para el diagnóstico de la E.K. La galactosilesfingosina (psichosina) o monogalactosil-diglicérido, no provee ventajas prácticas sobre el ensayo original para la hidrólisis de galactosilceramida; pues son más fáciles de obtener y de marcar radioactivamente; el procedimiento de ensayo es más complicado y la actividad en tejido puede ser más baja que hacia la galactosilceramida. Se ha encontrado que la enzima es más activa en presencia de galactosilceramida; existen 2 beta-galactosidasas genéticamente distintas en los tejidos humanos, que presentan actividad hacia galactosilceramida. La galactosilceramidasa I es probablemente idéntica a la galactosilceramida-beta-galactosidasa; y la galactosidasa II, es probablemente idéntica al gangliosido GM_1 -beta-galactosidasa, la cual es deficiente en la gangliosidosis GM_1 . Para el diagnóstico de la E.K., se debe usar un ensayo que determine galactosilceramidasa I exclusivamente. El procedimiento se realiza usando ácido oléico, cantidades relativamente pequeñas de sustrato y taurocolato de sodio, con ausencia de 16n cloro. Cuando estas precauciones son tomadas, la actividad galactosilceramidasa es nula hacia galactosilce-

ramida. La galactosilceramidasa II no es activada por taurocolato, pero es activada por taurodeoxicolato de sodio, por lo que se puede presentar error si el taurocolato es impuro; incluyéndose actividad debida a galactosilceramidasa [82].

La enzima en el suero es inestable y pierde actividad al almacenarse. — Una de las desventajas técnicas en el diagnóstico enzimático de la E.K., es la necesidad de marcar sustratos naturales radioactivamente para el ensayo. El uso de un ensayo más simple usando un sustrato cromogénico artificial sería de gran utilidad, aunque actualmente está en proceso de desarrollo [82, 97].

La concentración de proteínas en CSF, es usualmente alta; el conteo celular es normal. Un patrón electroforético de las proteínas en CSF es de ayuda diagnóstica, en donde la albúmina y alfa-2-globulina tienen niveles elevados y los niveles de beta-1-gamma-globulina son bajos [97].

3. PRUEBAS DE LABORATORIO.

3.1 FOSFATASA ACIDA.

Existe en eritrocitos y próstata; pero las elevaciones pequeñas de esta enzima reflejan ser provenientes de células sanguíneas y no de origen prostático.

3.1.1 Fundamento:

Se mide la actividad total de la fosfatasa del suero, a pH de 4.8, a través de la cantidad de p-nitrofenol que libera en condiciones estándar el sustrato de p-nitrofenilo, se hace una segunda medición en presencia de L-tartrato, que inhibe selectivamente la fosfatasa ácida de origen prostático; esto permite conocer las fosfatas ácidas de otro origen. La diferencia entre los 2 valores corresponde a la fosfatasa ácida de próstata.

3.1.2 Materiales y método:

1) Se preparan 3 tubos de ensayo que se rotulan: - total, tartrato y blanco; en los tres se pipetea: 1.0 ml de sustrato (fosfato de p-nitrofenilo) y 1.0 ml de amortiguador ácido (pH=4.8). Al tubo tartrato se añade una gota de solución de tartrato 1M. Los 3 tubos se calientan durante 5 min., en un baño de agua a 37°C.

2) Con micropipetas de 0.2 ml., se añade este volumen de suero o plasma a tubos: total y tartrato; y 0.2 ml de agua destilada al blanco. Se incuba durante 30 min exactamente a 37°C.

3) Los 3 tubos se sacan del baño; se añaden de inmediato a los 3 tubos 4.0 ml de NaOH 0.4N. Se mezcla por inversión.

4) Se prepara un blanco de suero mezclando 5.0 ml de NaOH y 0.2 ml de suero.

5) Se leen las absorbancias de los tubos: total y tartrato, blanco y blanco de suero 410 nm en el espectrofotómetro, estableciendo la absorbancia cero con agua destilada.

Cálculos:

Abs. prob. - Abs. bco. suero = Abs. total de fosfatasa ácida.

Abs. de resistente al tartrato - Abs. bco suero = Abs. fosfatasa resist. tartrato

Las absorbancias de fosfatasa ácida total y de fosfatasa resistente al tartrato se lleva a la curva de calibración. Las unidades obtenidas de la curva se multiplican por el factor de corrección 0.324, y se tiene directamente el valor de la fosfatasa resistente al tartrato.

Valores normales:

- Fosfatasa ácida total: Hombre adulto = 0.13-0.63 U/ml
Mujer adulto = 0.01-0.56 U/ml
- Fosfatasa de origen prostático:
Hombre adulto = 0.01-0.15 U/ml

Notas:

- La fosfatasa ácida es muy inestable; si el análisis no puede realizarse de inmediato el suero debe congelarse escoguido, añadiendo 0.02 ml de sol. al 20% v/v de ácido por cada 2.0 ml de suero, estabilizándose la fosfatasa ácida de origen prostático, pero no forzosamente la total. La muestra de sangre debe tenerse en el refrigerador mientras se coagula.

- Los eritrocitos contienen fosfatasas ácidas cuya actividad puede ser hasta 100 veces mayor que la del suero; la hemólisis, incluso muy ligera, puede dar lugar a errores importantes.

- El anticoagulante de elección es la heparina [23, 62].

3.2 DIAGNOSTICO DE GLICOESFINGOLIPIDOS POR ANALISIS DE SEDIMENTO URINARIO.

3.2.1 Fundamento:

El diagnóstico de pacientes con enfermedad de Krabbe, Gaucher, Fabry y Leucodistrofia Metacromática, puede hacerse por análisis químico de sedimento urinario.

3.2.2 Materiales y método:

Mediante la utilización de catéter se coelsta la orina de 24 hrs, la cual se somete a filtración sobre papel filtro previamente lavado con solución cloroformo-metanol proporción 2:1. El sedimento que se en

cuenta en el papel se deja secar. El procedimiento anterior se efectúa en pacientes y sujetos normales utilizados como controles.

Los glicoesfingolípidos del sedimento urinario son aislados y cuantificados. Para la extracción de lípidos totales, el sedimento contenido en el papel filtro se homogeniza en un mezclador añadiendo metanol (100 ml) durante alguno minutos. Se adicionan directamente 200 ml de cloroformo para dar una mezcla final de 300 ml de cloroformo-metanol 2:1. La suspensión es homogenizada otra vez, y filtrada por succión. El residuo del papel filtro se re-extrae 2 veces más como se indica arriba; los filtrados se combinan. Los glicoesfingolípidos son separados de los lípidos neutros y fosfolípidos por cromatografía en columna usando ácido sílico [28].

La fracción de glicoesfingolípidos se evapora hasta sequedad y sometida a hidrólisis alcalina en una mezcla equimolar de cloroformo y NaOH 0.6N en metanol (2 ml) por 60 min a temperatura ambiente. La solución es transferida a un tubo de prueba, y el frasco de metanolisis es lavado con 2 ml de C-M, 2:1, 3 veces; los lavados se combinan con la solución de glicoesfingolípidos. Se añaden 1.6 ml de agua y ácido hidrocórico (0.05 ml), para neutralizar la solución anterior, las fases combinadas se dializan al menos 24 hrs. El dializado es evaporado hasta sequedad, y los glicoesfingolípidos son separados por cromatografía en capa fina Y62U. Los glicoesfingolípidos individuales también pueden ser identificados y cuantificados por cromatografía líquido-gas después de la conversión hasta trimetilsililmetilglicósidos [27, 28].

3.2.3 Método de Cromatografía en Capa Fina:

1. Preparación de placas. El absorbente se mezcla con agua hasta formar una pasta. Las preparaciones relativas de pasta y agua condicionan el espesor de la capa y la rapidez del secado. Suele trabajarse con 30 g de gel de sílice y 50 ml de agua, para preparar 5 placas de 0.25 de espesor. Las placas se secan al aire sobre el nivelador, y se activan a una temperatura de 120°C durante una hora para quitar la mayor parte de agua. Para evitar que se absorba agua de la atmósfera se acostumbra conservar las placas en una estufa o desecador.

2. Colocación de las muestras. El material que se quiere someter a cromatografía suele ponerse a 1 cm del borde inferior de la placa. Se suele depositar una raya de 1-2 cm de longitud. La maniobra es fácil con jeringa Hamilton

de 50 microlitros, el solvente debe recorrer el cromatograma en dirección perpendicular a la coloración inicial del gel de sílice.

3. Revelado. Existen muchos solventes para revelar, si la cromatografía se destina al estudio de lípidos, se pueden separar lípidos no polares como colesterol y triglicéridos en un sistema que contenga éter de petróleo, éter dietílico y ácido acético (volúmenes: 90, 10 y 1 respectivamente). Los lípidos más polares como: monohexósidos de caramida y los fosfolípidos, se pueden separar con mezclas de cloroformo-alcohol etílico-agua (en volúmenes: 14, 6 y 1 respectivamente). Los lípidos muy polares como: gangliosidos, se pueden separar con las mismas mezclas (60, 40 y 9) y más fácilmente con alcohol propílico-agua (7 y 3).

4. Localización de las manchas. Los cromatogramas en gel de sílice pueden soportar tratamientos muy violentos. Es frecuente que se localicen las manchas de estos cromatogramas nebulizando sobre ellos ácido sulfúrico al 50% y calentándolos a 120°C durante 10 min. En ocasiones, algunos compuestos no se calcinan a pesar de este tratamiento, y es necesario añadir al ácido sulfúrico dicromato de potasio o algún otro oxidante.

Otro método es cubriendo el cromatograma adsorbente que contenga fluoresceína o colorantes similares y observándose después bajo luz ultravioleta. También se pueden localizar las manchas con métodos a base de isótopos radioactivos.

5. Estudio cuantitativo de las manchas. Existen actualmente en el comercio muchos densitómetros creados especialmente para medir la cantidad de sustancias en manchas situadas en cromatogramas en capa fina, pero éste es un método semicuantitativo. Los problemas que plantea el mantener un espesor con uniformidad absoluta de la placa de vidrio y del gel de sílice tienden a limitar la eficiencia del método; lo mismo ocurre con los límites de concentración dentro de los cuales se puede lograr la diferenciación. Las manchas localizadas se pueden sacar de la placa y someter a recuento añadiendo directamente el gel de sílice a una solución de centelleo de tolueno que contenga un gel tixotrópico (por ejemplo: Cab.O.Sil, Nuclear Chicago), [62].

3.3 DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER Y NIEMANN-PICK EN UNA PEQUEÑA MUESTRA DE SANGRE VENOSA.

3.3.1 Fundamento;

Las enzimas que catalizan la hidrólisis de glucocerebrósi-

dos y esfingomielina han sido demostradas en preparaciones de leucocitos humanos lavados.

3.3.2 Materiales y método:

La esfingomielina se marca con ^{14}C en el carbono del metil de la porción colina de la molécula [12]. Los leucocitos se separan de los eritrocitos por sedimentación diferencial, mediante la siguiente secuencia: 10 ml de sangre venosa se colocan en un tubo que contiene 2 ml de una solución que por cada 100 ml contiene 5 g de dextran, 0.7 g de cloruro de sodio y 50 mg de heparina; los contenidos son mezclados y los eritrocitos se sedimentan (45 min a temperatura ambiente). El plasma conteniendo leucocitos suspendidos es removido por una pipeta capilar, la suspensión se centrifuga durante 10 min a 600s. El sobrenadante es decantado y la pastilla de leucocitos es suspendida y lavada 2 veces con solución de cloruro de sodio al 85%. Los leucocitos se suspenden en solución isotónica de cloruro de sodio y las células son contadas en un contador Coulter; las suspensiones se ajustan con solución salina conteniendo de 20,000 a 60,000 leucocitos por microlitro. Las mezclas de incubación para la determinación de la actividad de la enzima enlazada al glucocerebrósido contienen de 50-100 microlitros de la suspensión de leucocitos, 15 micromoles de buffer de fosfato de potasio (pH 6.0), 300 microgramos de cloruro de sodio, 200 microgramos de Cutsicum (iso-octilfenoxipolioxi-etanol, Fisher Chemical Co.), y 125 micromoles de glucosa- ^{14}C -cerebrósido (440,000 cuentas/min mol) en un volumen final de 0.15 ml después de incubar durante 1 hora a -37°C , la cantidad de glucosa- ^{14}C unida se determina por espectrometría líquida de centelleo [46].

Por otro lado, para determinar la cantidad de la enzima enlazada a la esfingomielina, los leucocitos lavados se obtienen a partir de 5 ml de sangre venosa suspendida en 0.3 ml de NaCl (5 mg/ml). Las células suspendidas son enfriadas en baño a -10°C y sometidas a oscilación sónica por 15 seg. Las suspensiones se mantuvieron por una hora a 0°C y después se centrifugaron a 37,000s durante 20 min. Bajo estas condiciones, por arriba del 92% de la enzima enlazada a esfingomielina es recuperada en el sobrenadante de las preparaciones provenientes de pacientes N.P y de individuos normales. Las mezclas de incubación contienen de 10-50 microlitros de la preparación de enzima de leucocitos, 25 micromoles de buffer de acetato de potasio (pH 5.0), 70 micromoles de esfingomielina- ^{14}C (327,000 cuentas/min micromol), 50 microgramos de cloruro de sodio

y agua, dando un volumen final de 0.18 ml. Las mezclas fueron incubadas por una hora a 37°C, y la cantidad de esfingomielina hidrolizada se determina por espectrometría líquida de centelleo [46, 47].

3.4 DIAGNOSTICO HISTOLOGICO DIFERENCIAL DE ESFINGOLIPIDOSIS.

3.4.1 Fundamento:

Se puede realizar durante la vida o después de la muerte.- En el primer caso se puede tomar una biopsia de nervio periférico, como el safeno externo, para el diagnóstico de la L.M.; también pueden analizarse las neuronas de los plexos de Meissner o Auerbach en la biopsia de recto o puede tomarse una biopsia de cerebro. Después de la muerte se puede examinar todo el sistema nervioso. Las técnicas que se describen a continuación pueden aplicarse al material de autopsia.

3.4.2 Materiales y métodos:

Una buena biopsia de cerebro debe comprender de 3-5 g de tejido o más (en ningún caso menos de 1 g); debe incluir tanto corteza (sustancia gris) como sustancia blanca subyacente si se sospechan trastornos generalizados. Se deben someter a estudios virológicos pequeñas muestras representativas.

Para las micrografías electrónicas, se debe preparar pequeños cubos de 1 mm que se fijan inicialmente en glutaraldehído al 2.5%. Debe mandarse para análisis químico una muestra de 1 g como mínimo, que contenga sustancia gris y sustancia blanca. De ser posible, se conserva a 1 g aprox. a -20°C. El resto se somete al siguiente tratamiento:

- Se fijan bloques representativos en formol subacetato de plomo, líquido de Zenker, y formol-solución salina.

- Se preparan cortes en criostato (0.5 micras) de sustancia sin fijar (se pueden fijar con vapores de formol después de colocarlos en los portaobjetos); cortes por congelación de tejido fijado con formol y más tarde cortes en parafina de material fijado en las 3 soluciones mencionadas.

- Se tiñen por los siguientes métodos:

- a) Rojo O de aceite
- b) Negro B de Sudán
- c) PAS

- d) Azul de Toluidina
- e) Violeta de cresilo-ácido acético
- f) Hierro coloidal de Hale
- g) Aldehído fucsina de Gomori
- h) Azul Alciano
- i) Hemateína ácida de Baker
- j) Azul resistente luxol

A continuación se muestra una Tabla con las reacciones para cada una de las enfermedades estudiadas. Aunque la Tabla 7 no incluye todas las posibles combinaciones de los resultados, con distintos tipos de cortes y fijadores en varias enfermedades, puede verse que las reacciones de tinción en sí presentan limitaciones diagnósticas; pero cuando se interpretan en relación con detalles de historia clínica y características morfológicas, las limitaciones son menores. La observación se puede realizar por microscopía óptica o electrónica para determinar variaciones morfológicas.

| TINCION: | ENFERMEDAD | | | | | | | |
|----------------------------|------------|-----|------|------|------|------|-----|--|
| | N.P. | T.S | E.G. | E.F. | L.M. | E.K. | GM1 | |
| Rojo O de aceite | + | + | + | +/- | - | + | + | |
| Negro B de Sudán | + | + | + | + | + | +/- | + | |
| PAS | + | + | + | + | + | + | + | |
| Azul de Toluidina | r | r | r | rr | rr | rr | r | |
| Viol. de Cres. Ac. Acet. | av | av | av | av | pd | av | av | |
| Hierro Coloidal de Hale | - | - | - | - | - | - | + | |
| Aldehído Fucsina de Gomori | - | - | - | - | - | - | + | |
| Azul Alciano | - | - | - | - | + | - | + | |
| Hemateína Ácida de Baker | + | +/- | +/- | +/- | + | - | - | |
| Azul Resistente Luxol | + | - | - | - | + | - | + | |

Tabla 7. Reacciones más comunes para efectuar diferenciación entre Esfingolipidosis. r=rojo; rr=rojo rosado; av=azul violeta; pd=pardo dorado.

3.4.3 FIJACION DE TEJIDOS.

- Glutaraldehído:

Es un excelente fijador, muy empleado para la microscopía electrónica. También puede emplearse para trabajo ordinario con microscopio óptico (las piezas grandes necesitan uno o varios días de fijación). Debe emplearse glutaraldehído de grado biológico; se presenta en solución acuosa al 25 ó 50% y debe conservarse en refrigeración. Esta solución tiende a degradarse, formándose ácido glutárico, el cual se puede precipitar y eliminar cuando se prepara el fijador de glutaraldehído diluido, añadiendo aprox. 3 g - de carbonato de bario por cada 100 ml esperando 30 min y filtrando.

El glutaraldehído se emplea en concentraciones entre 3 y 6.5%, amortiguado a pH=7.4 con fosfato 0.1M. La fijación para microscopía electrónica debe realizarse entre 0 y 4°C; el tiempo necesario varía de 1 a 4 hrs según el tejido y tamaño de la pieza.

Una gran ventaja es que los tejidos que se fijan con glutaraldehído se pueden almacenar en amortiguador por varias semanas o meses antes del estudio. Además preserva mejor las proteínas celulares o plasmáticas que el formol, tal vez porque forma más enlaces transversales. Estos aumentan además la estabilidad y resisten a la ebullición e hidrólisis ácida. En términos generales, este efecto se manifiesta por una consistencia más firme y colores más intensos. El tejido se encoge menos que en formol y con muchos tejidos, en especial el nervioso, los cortes son mejores. Como la presión de vapor de este líquido es baja, es más cómodo y menos irritante para el técnico, que el formol; tampoco ataca a los metales. No produce dermatitis. Después de la fijación, pueden llevarse a cabo muchas técnicas de tinción ordinarias o histoquímicas.

- Formol solución salina:

Esta solución se prepara con agua destilada - 900 ml + NaCl (8.5 g) + formaldehído comercial (100 ml).

El grupo aldehído en el formol permite numerosas y complejas reacciones con los componentes tisulares. La principal es la acción polimerizante, es decir, la formación de compuestos y complejos de adición por creación de ligaduras entre las moléculas proteínicas. Estas reacciones producen alteraciones físicoquímicas celulares y por tanto, alteran la reactividad de los tejidos a ciertos colorantes histoquímicos. Sin embargo, muchos de estos cambios parecen

ser reversibles al aplicarse un lavado con agua, y en las técnicas habituales, cuando los tejidos son tratados después de sólo 6-24 hrs en formol, dichos cam bios todavía no son considerables.

El formol no afecta a los lípidos. Fija algunos lípidos complejos y no saturados, pero no actúa sobre las grasas neutras y los fosfolípidos tienden a difundirse lentamente en el fijador. La utilización de subacetato de plomo permite conservar una proporción mayor de lípidos en los cortes en parafina.

- Fijador de Zenker:

| | |
|----------------------|----------|
| Cloruro mercuríco | 50 g |
| Dicromato de potasio | 25 g |
| Sulfato de sodio | 10 g |
| Agua destilada | 1,000 ml |

Se añaden 50 ml de ácido acético glacial inmediatamente antes de usarlo.

A la temperatura ambiente, los bloques pequeños de 2-4 mm de espesor quedan fijados entre 2 y 6 hrs. Las muestras chicas sólo necesitan de 30-60 min, y los bloques de tamaño intermedio (2.5x0.4 cm) de 6-15 hrs según su consisten cia.

- Fijador de Helly (Zenker formulado):

La solución concentrada es igual que el fijador de Zenker, pero en vez de ácido acético glacial se añaden de 5-10 ml de solución concentrada de formaldehído a cada 100 ml inmediatamente antes del uso; proporcionando mejores resultados. Ambos fijadores son buenos para emplearse en médula ósea y bazo. Los fijadores de mercurio dan mejores resultados con tinción metacromática, y son los fijadores ordinarios de elección para preservar los detalles cuando se quieren hacer forografías.

La solución de Zenker destruye eritrocitos y elimina gran parte del hierro de la hemoglobina. Al respecto es preferible la solución de Helly. La penetra ción de fijadores a base de mercurio es muy lenta más allá de los 2 ó 3 primeros mm; si los tejidos se dejan por más de uno o dos días, se vuelven muy densos y quebradizos. Los cortes por congelación de tejidos fijados en soluciones mercuriales son muy difíciles de practicar.

Todas las soluciones fijadoras mercuriales provocan la formación en los tejidos de gránulos negros difusos, y éstos depósitos mercuriales deben ser eli minados antes de la tinción, añadiendo alcohol usado inicialmente para la deshi

dratación; la cantidad suficiente de solución saturada de yodo en alcohol al - 96% para obtener un color pardo oscuro. La coloración de los tejidos causada por el yodo es eliminada durante el tratamiento con alcohol absoluto en las últimas etapas de la deshidratación.

3.4.4 TINCIONES.

- Rojo de Sudán:

Se añade 0.4 g de colorante en 1 lt de alcohol etílico al 60% v/v; se lleva a ebullición bajo un condensador de reflujo, y se deja la solución a 30°C toda la noche, con agitación constante. La solución final se filtra y se mantiene a 33°C. Las preparaciones fijadas se tiñen durante 18 -24 hrs a 30°C en cajas herméticas; se lavan durante 2-4 min por agitación con agua y se dejan secar para posteriormente ser observadas al microscopio.

- Rojo O de Aceite:

En la tinción para lípidos neutros, mediante cualquier de los métodos de transferencia de colorantes por solubilidad diferencial, por ejemplo Rojo O de Aceite o los Sudanés, conviene emplear cortes obtenidos por flotación libre. Si se emplean cortes montados, en especial cortes de tejido fresco en criostato, la tinción de la grasa suele ser incompleta, superficial y poco informativa.

Preparación: Se prepara una solución saturada de colorante diazoico, el Rojo O de Aceite (xileno-azoxileno-azo-beta-naftol) disolviendo de 250-500 mg en 100 ml de alcohol isopropílico al 99%. Para el uso, se diluye a razón de - 6 ml de solución concentrada y 4 ml de agua destilada. Se mezcla y se deja reposar de 5-10 min antes de filtrar; esta solución diluida debe utilizarse en las 2-4 hrs siguientes.

Método:

1. Se preparan cortes por congelación de 10-40 micras (la grasa por ejemplo, puede desaparecer de los cortes delgados de algunos tejidos como el pulmón; en este caso es mejor preparar cortes de 25-35 micras; lo mismo puede decirse del cerebro (cortes de 15-25 micras).
2. Se lava en agua destilada y se tiñe con Rojo O de Aceite durante 10 min
3. Se lava con agua corriente y al colocarlos en ésta se extiende bien.
4. El colorante de contraste es el hemalumbre de Mayer o la hematoxilina

con alambre de cromo de Gomori, durante 1-3 min.

5. Se azulea con agua corriente que contenga algunas gotas de una solución saturada de carbonato de sodio (o fosfato disódico al 1%).

6. Se pasa a un baño de agua limpia, se recoge sobre un portaobjetos limpio por flotación. Se deja escurrir, pero no debe secarse.

7. Se monta en glicerina, en medio de Farrat o en jarabe de goma de von Apathy.

Resultados:

Las grasas neutras son de color rojo brillante, los núcleos azules y los demás tejidos pardos.

- Negro de Sudán:

Esta sustancia al igual que la anterior permite demostrar la presencia de gránulos lipídicos en leucocitos o muestras de tejido nervioso.

El reactivo se prepara añadiendo 100 ml de alcohol etílico absoluto a 0.5 g de Negro de Sudán. Se agita cuidadosamente durante 1-2 días hasta disolución completa del colorante, y se filtra.

Solución amortiguadora:

| | |
|---|--------|
| Fenol (grado analítico) | 16 g |
| Alcohol etílico | 30 ml |
| Solución acuosa al 0.3% de fosfato ácido de sodio hidratado | 100 ml |

Método:

Inmediatamente antes de usarlo, se añaden 60 ml de colorante a 40 ml de amortiguador, se mezcla y filtra. Esta es la solución diluida.

1. Los frotis o biopsias secados al aire se fijan en vapor de formol durante 10 min.

2. Se colocan en la solución diluida durante 30 min a 37°C.

3. Se lavan con alcohol etílico.

4. Se lava con agua destilada.

5. Si se quiere, se aplica como colorante de contraste Giemsa diluido (1:20) durante 1 hora.

6. Se monta con un cubreobjetos o se examina directamente.

Resultados:

Las partículas lipídicas tienen un color negro intenso.

- PAS (Acido para-aminosalisílico):

Aunque se pierde la mayor parte de lípidos durante la preparación en parafina, quedan algunas sustancias que contienen lípidos y dan reacción positiva al PAS, como ceroides, lipofuscinas, pigmento de melanosis y lípidos complejos de varias enfermedades por almacenamiento. Además, la fijación con formol impide que la esfingomielina y las cefalinas sean extraídas por los solventes de lípidos.

Como regla general, la intensidad de la reacción PAS es proporcional al contenido de carbohidratos en la muestra estudiada.

Método:

1. Se elimina la parafina de los cortes; y éstos se hidratan, después de quitar los precipitados de mercurio en caso necesario. Se tife en paralelo un corte testigo positivo.

2. Se oxida durante 5 min con ácido peryódico al 0.5% en agua.

3. Se enjuaga con agua destilada.

4. Se deja 5 min en reactivo de Schiff (10 min para cortes por congelación).

5. Se enjuaga en 3 baños de solución fresca de sulfito, 2 min cada vez.

6. Se lava durante 5-10 min con agua corriente.

7. Facultativo: se aplica como colorante de contraste hematoxilina de Harris durante 1-3 min.

8. Sumergir rápidamente de 3-5 veces el portaobjetos en alcohol ácido al 1%, lavando después con agua corriente y azulando con sustituto de Acott para el agua de la llave, luego se lava 5 min con agua.

9. Se deshidrata, aclara y monta en Clarita o Permout.

Resultados:

Tras coloración de contraste con hematoxilina, los núcleos son azules. Las sustancias positivas al PAS toman color rojo púrpura.

- Hierro Coloidal de Hale:

Preparación: A 250 ml de agua destilada hirviendo se añaden 4.4 ml de cloruro férrico al 29% y se agita. Cuando el color es rojo intenso, se quita de la llama y se deja enfriar. El agua debe hervir durante la adición del cloruro férrico, so pena de que la formación de óxido férrico coloidal (hidratado) sea incompleta. Esta solución se conserva durante meses.

Método:

1. Se tratan 2 cortes de parafina con agua, y los precipitados de mercurio se eliminan con yodo y tiosulfato cuando sea necesario.
2. Se enjuaga brevemente (alrededor de 30 seg) en ácido acético al 12%.
3. El corte problema se trata durante 60 min con solución diluida de hierro coloidal. El corte control no debe ponerse en hierro coloidal.
4. Se enjuagan los cortes en 4 baños de ácido acético al 12%, 3 min cada vez.
5. El corte problema y el control se tratan durante 20 min a temperatura ambiente con una mezcla recientemente preparada a partes iguales de HCl al 2% (sin hierro) y ferrocianuro de potasio.
6. Se lava durante 5 min con agua corriente.
7. Tinción de contraste: hematoxilina de Harris durante 5 min, seguido de lavado en agua corriente durante 2 min y diferenciación en alcohol-ácido al 1%; luego se lava durante 10-15 min en agua corriente.
8. Se deshidrata, aclara y monta en Permount.

Resultado:

Regiones ricas en gangliosidos GM_1 dan coloración azul brillante.

- Azul Alciano:

Es la tinción específica de grupos sulfato. Al pH del - Azul Alciano de Mavry en ácido acético al 3%, o sea 2.5; se disocian los grupos carboxilo y sulfato, y ambos fijan al colorante. Si se baja el pH, sólo se tiñen los grupos sulfato. Sin embargo, se observa que durante el lavado ulterior el pH vuelva a subir y los grupos carboxilo empiezan a fijar el colorante; pero si se secan completamente los cortes antes de la deshidratación, los grupos -COOH siguen sin teñir.

Método:

1. Se hidratan los cortes.
2. Se tiñe 30 min con Azul Alciano 8 GS al 1% en HCl 0.1N, para tener un pH de 1.0 (para un pH=0.5, se disuelve en HCl 0.5N).
3. Se sacan los cortes y se secan completamente con papel filtro.
4. Se deshidrata, aclara y monta en forma habitual.

Resultados:

Los compuestos mucoides sulfatados son azules.

- Azul Astral:

Este colorante parece muy semejante al Azul Alciano, al que puede reemplazar para la tinción de gangliosidos y sulfátidos. Los cortes hidratados se tiñen de 5-15 min en Azul Astral al 1% en ácido acético al 1-3%, luego se secan con papel filtro, se deshidratan por varios baños de alcohol, se aclaran y montan. Los gránulos de células y mucopolisacáridos ácidos toman un color azul.

- Azul de Toluidina: (tinción metacromática)

Las muestras de Azul de Toluidina difieren por el grado de metacromasia que producen, y sobre todo por la resistencia de dicha metacromasia frente a la deshidratación por alcohol.

Método:

1. Se emplean cortes de tejido fresco en criostato, fijados por congelación o incluidos en parafina. Estos últimos se deben tratar con agua.
2. Se tiñe de 1-10 min con Azul de Toluidina al 0.1% en agua (de 5-30 min si la concentración es de 0.001%).
3. Se enjuaga con agua destilada, para estudios histoquímicos se examina en agua.
4. Se monta en jalea de glicerina.

Algunos histólogos prefieren el Azul de Toluidina al 0.1% en alcohol etílico al 30%. Los resultados son más específicos, y las imágenes más claras (porque no existe tinción ortocromática) cuando las soluciones colorantes se preparan en amortiguador de Michaelis de acetato y verona, de pH=3.2 (respetando las concentraciones mencionadas).

Resultados:

La metacromasia gamma (mucopolisacáridos ácidos y gránulos de células cebadas), producen un color rojo púrpura o rosa. La metacromasia beta se presenta como color violeta; la tinción ortocromática es azul.

- Violeta de Cresilo al 1% de Acido Acético al 1%:

(ver diagnóstico de L.M.)

- Hematefina Ácida de Baker:

Los tejidos se fijan en formol-calcio, después de lo cual se tratan con cromo. La tinción con hematefina ácida tiene co-

mo consecuencia la formación de una laca negra de cromo; diferenciando con ferrocianuro-borax, se elimina la mayor parte del colorante fijado en forma ineficaz.

Método:

1. Se fijan fragmentos tisulares pequeños con formol-calcio de Baker durante 6 hrs (10 ml de formol concentrado, 10 ml de cloruro de calcio anhidro al 10% en agua, 80 ml de agua destilada).
2. Sin lavar, se pasa a solución de dicromato de potasio al 5% que contiene 1% de cloruro de calcio; se deja 18 hrs a temperatura ambiente.
3. Se pasa a otra solución fresca de dicromato de calcio, a 60°C donde se deja 24 hrs.
4. Se lava con agua corriente durante 6 hrs y se enjuaga con agua destilada.
5. Se preparan cortes por congelación de 10 micras, que se incluyen en gelatina si es necesario.
6. Se aplica solución de dicromato de calcio durante una hora a 60°C, como mordiente.
7. Se lava cuidadosamente varias veces con agua destilada.
8. Se deja 5 hrs a 37°C en hemateína ácida (0.05 g de hematoxilina en un matraz; se añaden 48 ml de agua destilada y 1 ml de yodato de sodio al 1%. Se lleva a ebullición, se deja enfriar y se añade 1 ml de ácido acético glacial. Debe emplearse el día que se preparó.
9. Se enjuaga con agua destilada.
10. Se diferencia durante 18 hrs a 37°C en solución de ferrocianuro-borax (0.25 g de ferrocianuro de potasio y 0.25 de borax en 100 ml de agua destilada; debe conservarse en la oscuridad).
11. Se lava con agua corriente durante 5-10 min se enjuaga con agua destilada. Se monta en jalea glicerina.

Resultados:

Los fosfolípidos, la esfingomielina y las nucleoproteínas son de color azul oscuro hasta negro azulado, el fibrinógeno tiene un color azul pálido turbio, la hemoglobina es gris y el citoplasma amarillo claro.

- Aldehído-Fucsina de Comori:

En presencia de ácidos minerales fuertes - la fucsina básica produce colorantes púrpura intenso con ciertos aldehídos. Pa

ra preparar el colorante se disuelve 0.5 g de fucsina básica en 100 ml de alcohol al 60-70%. Se añade 1 ml de paraldehído (U.S.P.), seguido de 1.5 ml de HCl concentrado. Al cabo de 24 hrs aprox a temperatura ambiente, la mezcla toma un color púrpura intenso y tarda 3 días a 20°C en madurar. El tiempo necesario para la tinción con solución madura variaba entre 2-10 min, pero que a partir de 4-5 días después de la preparación del colorante, dicho tiempo de tinción empezaba a aumentar rápidamente; un mayor envejecimiento significa pérdida de la selectividad.

Método:

1. Se quita la parafina de los cortes y éstos se hidratan.
2. Se trata durante 30 min con solución de yodo de lugol; así mejora la tinción. Si se prefiere se puede oxidar durante 2 min con una mezcla a partes iguales de permanganato de potasio y ácido sulfúrico, ambos al 0.5%.
3. Se blanquea durante 2 min con tiosulfato de sodio al 5% (o durante 1 min con ácido oxálico al 1%, después de lo cual se lava 5 min con agua de la llave, si se empleó oxidación con permanganato-ácido).
4. Se enjuaga cuidadosamente durante varias veces con agua destilada.
5. Se tiñe con aldehído-fucsina, madura durante 2-10 min. Se llega al punto final cuando las células se ven claramente de color púrpura oscuro, sobre un fondo incoloro o ligeramente lila.
6. Se enjuaga cuidadosamente con alcohol al 95% y se deja en un tercer baño de alcohol durante 5-10 min.
7. Se enjuaga con alcohol al 70% y se enjuaga con agua destilada.
8. Se tiñe con hematoxilina de Ehrlich durante 3-4 min.
9. Se enjuaga con agua destilada y se diferencia con HCl al 0.5% en alcohol al 70% (3-4 sumersiones).
10. Se azulea con agua de la llave (de 5-10 min).
11. Como colorante de contraste, se aplica durante 45 seg: 100 ml de agua destilada + 0.2 g de verde claro S.F. + 1.0 g de anaranjado G + 0.5 g de ácido fosfotúngstico + 1.0 ml de ácido acético glacial. Este colorante de contraste se conserva por tiempo indefinido.
12. Se enjuaga rápidamente con ácido acético al 0.2%, seguido de alcohol al 95%.
13. Se deshidrata con alcohol absoluto, se aclara con xileno y se monta.

Resultados:

Las células conteniendo gangliosidos se tiñen de color púrpura violeta.

- Azul resistente de Luxol:

Al estudiar muchos colorantes de azul y negro de luxol, se encontró que el azul ARN resistente de luxol, sal de diarilguanidina de un colorante azoico sulfatado, presentaba una máxima afinidad por los fosfolípidos y las vainas de mielina.

Fijación:

Son satisfactorios el formol (10%) y el calcio-formol de Baker, pero se obtienen mejores resultados con 24-36 hrs de fijación de bloques de tejidos cerebrales de 5 mm de espesor en la siguiente solución: se disuelven 10g de cloruro de calcio en 900 ml de agua destilada; se añaden 5 g de bromuro de cetiltrimetilamino, y se disuelve finalmente, se añaden 100 ml de solución concentrada en formol. Una vez fijados, los bloques se enjuagan con agua destilada, se deshidratan y se incluyen en parafina. El material fijado en formol ordinario, puede mejorarse colocándolo en este fijador especial durante 24 hrs - antes de la inclusión.

Solución colorante:

| | |
|--|----------|
| Azul ARN resistente de luxol (Du Pont) | 0.1 g |
| Alcohol etílico al 95% | 100.0 ml |
| Acido acético glacial | 0.02 ml |

Método:

1. Se quita la parafina de los cortes y éstos se hidratan para quitar las últimas sales de calcio solubles.
2. Se deja en alcohol etílico al 95% durante un lapso de 2 min aprox.
3. Se incuba de 2-3 hrs entre 35-40°C, en solución de azul ARN resistente de luxol.
4. Se enjuaga con alcohol al 95% y con agua destilada.
5. Se deja 2 seg en carbonato de litio al 0.005% (en agua).
6. Se diferencia con alcohol etílico al 70%.
7. Se deja en agua destilada hasta aplicar tinción de contraste. Puede ser con hematoxilina con la serie PAS-hematoxilina, o PTAH de Mallory.
8. Se deshidrata, aclara y monta en la forma habitual.

Resultados:

Las vainas de mielina y fosfolípidos toman un color azul intenso [62].

3.5 CULTIVO DE FIBROBLASTOS.

Fibroblastos normales y de pacientes con alguna esfingolipidosis se obtienen líneas celulares derivadas de biopsias superficiales de piel en voluntarios normales y pacientes con ~~enfermedad confirmada~~. Los cultivos celulares son mantenidos en medio esencial mínimo Eagle suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 100 unidades de penicilina y 100 microgramos de estreptomycin/ml, con 95% de aire humidificado y 5% de bióxido de carbono a 37°C. Las células fueron recogidas por lavados de monocapas (3 veces) con buffer de fosfato-salino (PBS) y tratamientos subsecuentes con 0.05% de tripsina por 5 min a 37°C. Las condiciones experimentales específicas para cada cultivo se desarrollan de acuerdo a la enzima en estudio [95].

3.6 COLESTEROL.

3.6.1 Fundamento:

Una solución clorofórmica de colesterol es mezclada con -- ácido sulfúrico concentrado en anhídrido acético para producir un color verde parduzco intenso, a temperatura entre 15-25°C, que tiene el punto máximo de absorción a 620 nm. En el método según Liebermann-Burchard, se prescinde de la extracción y desproteinización.

Reactivos:

1. Reactivo de colesterol (anhídrido acético 6.33 M en ácido acético 99--100%).
2. Solución patrón de colesterol (300 mg/100 ml).
3. Acido sulfúrico 95-97%.

3.6.2 Materiales y método:

| | PROBLEMA | PATRON | BLANCO |
|--|----------|---------|---------|
| Suero | 0.05 ml | - | - |
| Solución Patrón | - | 0.05 ml | - |
| Agua destilada | - | - | 0.05 ml |
| Reactivo de colesterol | 2.00 ml | 2.00 ml | 2.00 ml |
| Al cabo de 10-60 min pipetear por la pared de cada tubo directamente sobre la superficie del tubo. | | | |
| Acido Sulfúrico | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml |

Colocar los tubos de ensayo inmediatamente después de la adición del ácido sulfúrico en un baño de agua a temperatura ambiente y agitar. Sacar los tubos del baño de agua al cabo de 5 min como mínimo y desprender agitando las proteínas que puedan haberse adherido a la pared del tubo. Medir extinciones de los problemas y el patrón contra el blanco 10-30 min después de la adición del ácido sulfúrico.

Cálculo:

$$\frac{\text{Extinción del problema}}{\text{Extinción del patrón}} \times 300 \text{ mg/100 ml}$$

Valores Normales:

| | |
|---------------------------|---------------------|
| - Recién Nacido | : 45-100 mg/100 ml |
| --Entre un mes y 20 años: | 110-250 mg/100 ml |
| - 40 años hombre | : 135-315 mg/100 ml |
| - 40 años mujer | : 135-290 mg/100 ml |
| - 50 años hombre | : 150-340 mg/100 ml |
| - 50 años mujer | : 145-330 mg/100 ml |

3.7 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Utiliza resinas que son acopladas con aniones o cationes que se intercambian con otros aniones o cationes del material que atraviesan estas resinas; que son polímeros sintéticos altamente insolubles que contienen grupos funcionales alcalinos: $(\text{NH}_3, +\text{N}(\text{CH}_3)_4)$ o ácido $(\text{COOH}, \text{SO}_2\text{H})$. Fundamentalmente se usan 2 tipos de resinas: aniónicas, de dietilaminoetileno (DEAE), y catiónicas, la carboximetilcelulosa (CM). La Dowex 50 y la Amberlite IR 100 son resinas de intercambio catiónico, puesto que tienen grupos básicos de intercambio iónico. La separación se aumenta por el cambio de pH o de la carga iónica, o de ambos, en el amortiguador al igual que la temperatura, durante el fraccionamiento por elución gradual en la columna de cromatografía (cambio lento o continuo) o por elución de cada paso. Es esencia, las resinas pueden considerarse como ácidos o bases polifuncionales que son insolubles [23, 62].

3.8 ELECTROFORESIS EN GEL-ALMIDON.

3.8.1 Fundamento:

Una partícula coloidal o un ión, provistos de carga eléctrica

ca; emigran hacia el ánodo o cátodo bajo la influencia de un campo eléctrico externo. Si las distintas partículas tienen diferentes velocidades de desplazamiento, puede aprovecharse esta propiedad para separarlas en distintas clases. El emplear fuerzas eléctricas para lograr esta separación se llama electroforesis.

3.8.2 Materiales y método:

La muestra se coloca en un canal o pozo que se corta o moldea en una capa delgada de gel-almidón, agarosa o acrilamida; luego se aplica el voltaje deseado. La velocidad de migración depende del gel; en almidón se necesitan de 16-20 hrs para una buena separación. La concentración del amortiguador para la separación del gel es de gran importancia. Aumentando el voltaje la separación es más rápida, pero si se pasa de 250 volts, se presentan problemas de sobrecalentamiento. Para cada técnica hay que estudiar la mejor solución intermedia tomando en cuenta el espesor del gel, la concentración del amortiguador, el voltaje aplicado y el volumen de la muestra.

Después de la electroforesis, las fracciones proteínicas se localizan por tinción, con colorantes afines a las proteínas, por ejemplo: negro amido,ponceau S, cuando se requiere una sensibilidad alta se emplea nigrosina. El gel puede secarse hasta formar una película delgada sobre el soporte transparente, luego se mide la cantidad de las distintas fracciones teñidas haciendo pasar la placa frente a una fuente de luz. Se desplaza el gel teñido a velocidad constante, entre una hendidura que recibe una luz intensa y una fotocelda. Cuando las regiones intensamente teñidas donde se encuentran las proteínas pasan frente a la hendidura, el voltaje producido por la fotocelda varía proporcionalmente a la intensidad de la coloración, o sea a la cantidad de proteínas. Aunque la electroforesis en gel-almidón suministra principalmente información cualitativa; también es posible el estudio cuantitativo de las distintas reacciones teñidas por elución del colorante, y medición de la absorbancia de los líquidos de elución en el espectrofotómetro.

El gel-almidón, además del efecto separador de las fuerzas eléctricas, existe un efecto de "tamiz" a nivel molecular, pues el gel bien preparado sólo tiene poros muy pequeños. La consecuencia es una mayor discriminación de los grupos de proteínas. Utilizándose esta propiedad en la separación de isoenzimas [62].

3.9 DIAGNOSTICO DE LA LEUCODISTROFIA METACROMATICA.

3.9.1 - Prueba de Tinción Metacromática:

Se mezclan 2 gotas de solución acuosa de azul de metileno al 2% p/v con el sedimento que queda después de centrifugar 15 ml de orina fresca. Se deja reposar durante varios minutos, se pasa una gota de suspensión a un portaobjetos, se cubre y se espera durante algunos minutos. Se examina con el objetivo seco fuerte o de inmersión buscando gránulos rojo-brillante de 8 a 70 micras de diámetro. Pueden presentarse aislados o en acúmulos, o como inclusiones en las células epiteliales. La presencia de estos gránulos es característica de la L.M. (lipidosis por sulfátidos); también puede presentarse en otros trastornos del metabolismo de lípidos que afectan al SNC, por ejemplo: E.T.S. Se ha propuesto el siguiente método como prueba algo más específica de la lipidosis por sulfátidos.

3.9.2 - Prueba de Tinción con Violeta Rápido de Cresilo:

Se centrifuga entre 2,000 y 3,000 rpm durante 10 min una muestra de orina fresca, de preferencia no la primera de la mañana. El sobrenadante se desecha y se preparan 6 frotis con el sedimento, sobre portaobjetos limpios; después de fijarse en vapores de formol a 60°C durante 1 hr, los portaobjetos se lavan con agua, y se tiñen a temperatura ambiente durante 10 min con una solución acuosa al 1% de violeta rápido de cresilo. El pH del colorante debe ajustarse entre 3.5-3.6 con ácido acético antes del uso. Los frotis teñidos se lavan con agua y se montan en jalea de glicerina. El resultado positivo se traduce por la aparición de sustancia parda de tinción metacromática en el citoplasma de células epiteliales de origen renal. Sólo es importante la sustancia intracelular a menudo se ve sustancia parda extracelular, que no tiene valor.

3.9.3 Prueba de Sulfatasa A en orina:

Es la prueba más específica.

Reactivos:

Sulfato de amonio en gránulos
Amortiguador de ácido acético (0.5 N; pH=5.0)
Acetato de sodio (0.1 N; pH=5.0)
Soluciones de HCl (0.05N y 0.01N)

NaOH 6 N

Solución ácida de éter.

Se agitan 5 volúmenes de éter anhidro con 1 volumen de HCl 0.05 N. Se espera a que las fases se separen; la fase interior de ácido se separa y se desecha. La fase de éter no debe tener gotitas de HCl.

Reactivo de Sulfatasa A. Se prepara de la siguiente manera:

| | |
|------------------------------------|----------|
| p-nitrocalecol, sal disódica | 165.0 mg |
| Pirofosfato de sodio decahidratado | 11.2 mg |
| NaCl | 5.0 mg |

Se disuelven en amortiguador 0.5 M de ácido acético y acetato de sodio, - se afora a 50 ml con el propio amortiguador.

Método:

1. Se recogen cuando menos 50 ml de orina; lo mejor es hacerlo en la mañana, después de desechar la primera muestra de orina nocturna. Se mide el contenido de creatinina; debe ser superior a 20 mg/100 ml, lo cual indica una muestra bastante concentrada. Se verifica el pH con el potenciómetro; debe ajustarse a 5.0 por adición cuidadosa de ácido diluido si es necesario.

2. Se añade sulfato de amonio sólido, a razón de 47.3 g/100 ml de orina.- Para esta técnica, el precipitado que producen 50 ml de orina es suficiente. - El sulfato de amonio debe disolverse completamente.

3. Se centrifuga a 10,000 rpm durante 10-15 min. El sobrenadante se vierte y desecha.

4. El precipitado compacto se disuelve en 2.0 ml de amortiguador de acetato 0.01 N.

5. Se pipetea 1.5 ml de esta solución de amortiguador de acetato en una probeta de 25 ml provista de tapón. Se añaden 1.5 ml de reactivo de sulfatasa A, se agita, y se calienta a 75°C, +/- 3°C durante 10 min.

6. Se añaden 10 ml de HCl 0.01 N y se mezcla por inversión 5 veces. Se deja reposar 15 min.

7. Se añaden 5 ml de éter ácido. Se mezcla por inversión 5 veces; no hay que agitar; se deja en reposo hasta que se separen las fases.

8. La fase de éter se pasa a un tubo de ensayo limpio, se añade 1 gota de NaOH 6 N y se agita cuidadosamente. Se deja en reposo hasta que aparece color en el fondo del tubo de ensayo.

Resultados:

En la L.M. se obtiene un color amarillo brillante. En los testigos normales, el color va desde anaranjado hasta rojo intenso [62].

3.10 PREPARACION DE LEUCOCITOS Y FIBROBLASTOS.

Para la preparación de leucocitos, las siguientes soluciones stock son preparadas:

1. D-glucosa 0.020 M; ácido cítrico 0.006 M, citrato de sodio anhidro 0.11M
2. Dextran 6% p/v en NaCl 0.9%
3. D-glucosa 5% en NaCl 0.9%
4. NaCl 3.6%

Las soluciones 1; 2 y 3 son mezcladas en las proporciones: 1.5, 5.0 y 3.5 y guardadas en refrigeración hasta su uso.

10 ml de sangre completa heparinizada, se guarda en hielo hasta su uso (preferiblemente no más de 1 hr), y se adiciona a un volumen igual de la mezcla descrita arriba. Esta suspensión es bien mezclada por inversión y se mantiene a temperatura ambiente de 15-45 min o hasta que los eritrocitos han sedimentado completamente.

La capa superior es removida por aspiración y es centrifugada en frío a 350 s durante 15 min. El sobrenadante es descartado y la pastilla es suavemente resuspendida en 2-4 ml de NaCl al 0.9% y se adiciona solución salina hasta un volumen final de 8 ml. Se adiciona agua destilada fría (24 ml) y la suspensión es mezclada por inversión y se centrifuga hasta 90 s para hemólisis de los eritrocitos restantes. Finalmente 8 ml de solución salina 3.6% fría es adicionada y mezclada, la suspensión es centrifugada como se indica arriba. Si la pastilla todavía contiene grandes cantidades de eritrocitos, la hemólisis se hace de otra manera: la pastilla suspendida en 2-5 ml de solución salina al 0.9% transferida hasta un tubo pequeño y recentrifugada por 15 min.

Si los eritrocitos residuales permanecen sobre la capa de la pastilla, 0.1 ml de sobrenadante se desecha. Las pastillas pueden almacenarse en refrigeración, pero si no son usadas durante 1-2 días, se agrega 0.1 ml de agua sobre la capa de la pastilla para prevenir pérdida de agua de los leucocitos mientras son almacenados.

Los fibroblastos obtenidos por medio de explante son subcultivados hasta obtener 5, 000, 000-10, 000, 000 de células de confluencia y son recogidas de

2-5 días después de la confluencia. Los fibroblastos son centrifugados fuera del medio y resuspendidos de 2-5 ml de solución fría conteniendo sucrosa 0.25M, NaCl 0.05M, Tris-cloruro 0.01 M, pH=7.3 y centrifugado a 500 s durante 45 min. La pastilla resultante es almacenada para el ensayo enzimático [62].

3.11 ENSAYOS ENZIMATICOS.

Los leucocitos provenientes de 10 ml de sangre son suspendidos en 1 ml de sucrosa fría 0.25 M; 10 microlitros de una solución Triton X-100 al 10% v/v es adicionada para dar una concentración final de 0.1% y la suspensión es sonicada a 30 s. Los fibroblastos son suspendidos en 0.1 ml de sucrosa fría 0.25 M por 10, 000, 000 de células, con breve sonicación, y el Triton X-100 es adicionado para dar una concentración de 0.1%. El contenido de proteína de la suspensión resultante de fibroblastos y leucocitos tiene un rango de 2-5 mg/ml.

La ventaja es tomar los efectos diferenciales de la concentración de cloruros sobre ASA y ASB para determinar la actividad específica de la ASA; esto se acompaña de lo siguiente: la ASA es determinada usando una concentración final de buffer-acetato de sodio 0.5 M, pH=5.0, sulfato-nitrocatecol 0.005 M, NaCl 0.75 M y de 50-200 microgramos de proteína de leucocitos o fibroblastos en un volumen final de 200 microlitros incubados a 37°C durante 60 min. Los blancos contienen los mismos componentes, menos sustrato, incubando como se describe, las reacciones son terminadas por la adición de 0.4 ml de NaOH 1.0 M, el sustrato es adicionado a los blancos y las absorbancias de todos los tubos son leídas a 515 nm. Una curva estándar es preparada usando 4-nitrocatecol.

La hexosaminidasa es usada como una enzima de referencia; ésta provee una verificación hacia el deterioro no específico de todas las enzimas de tejidos durante preparaciones o almacenaje de leucocitos o fibroblastos, y también los posibles niveles enzimáticos alterados en fibroblastos que surgen de, por ejemplo, diferentes lapsos de tiempo en cultivos para diferentes líneas celulares. Cuando los datos para ASA están relacionados con niveles de hexosaminidasa, el resultado provee una guía más segura para la evaluación de casos en cuestión a las actividades específicas de la ASA sola [61].

La hexosaminidasa en leucocitos es ensayada en un volumen final de 200 microlitros conteniendo buffer de ácido-cítrico-fosfato de sodio 0.05 M, pH=4.0, p-nitrofenil-beta-N-acetilglucosamido 0.005 M, y de 10-50 microgramos de proteína. La hexosaminidasa de fibroblastos es ensayada en 200 microlitros conte

niendo acetato de sodio 0.05 M, pH=5.4, p-nitrofenil-beta-N-acetilglucosaminido 0.0025 M y de 10-50 microgramos de proteína.

Los blancos se preparan como se describe para la ASA. Las reacciones son detenidas después de 30 min a 37°C por adición de 1.8 ml de glicina 0.2 M-carbonato de sodio 0.3 M (pH=9.8 hasta 10.0), las absorbancias se determinan a 400 nm. El p-nitrofenol es usado para preparar una curva estandar [16, 62].

3.12 RADIOMARCADO DE GALACTOSILESFINOSINA EN EL DIAGNOSTICO DE LA E.K.

El alcohol primario que se encuentra en el carbono 6 de la galactosa de la molécula galactosilesfingosina es tritiada.

La obtención de galactosilesfingosina se hace como sigue: los lípidos totales se extraen de los tejidos utilizando cloroformo-metanol (2:1 v/v); los cuales se adsorben en una columna de Ag 50 x 8. Los lípidos catiónicos se eluyen con cloruro de calcio (0.4 M)-metanol (1:3 v/v). Los materiales hidrofílicos son removidos por rollos de Sep-Pak C18. La galactosilesfingosina aislada se une a o-phtaldehído, el cual se pasa a través de columnas AG 50 x 8 y AG 1x2. La muestra final se introduce en cromatografía líquida de alta resolución, la cual consiste en una columna de sílica-gel (Chamcosorb 250 x 5.2 mm) y solvente por sistema de gradiente de elución desde 0 hasta 45% etanol-agua (100:2 v/v) en hexano por 30 min con una velocidad de flujo de 1.5 ml/min. La solución final se deja evaporar a temperatura ambiente durante 24 hrs.

El radiomarcado se lleva a cabo de la siguiente manera: después de ser oxidada con galactosa oxidasa y peroxidasa, la forma monomérica de la galactosilesfingosina oxidada es separada de las formas oligoméricas entre el grupo aldehído y el grupo amino libre, y del compuesto restante no oxidado, por medio de cromatografía en capa fina con sílica-gel. Las placas de sílica-gel (20x20x0.5 cm) son reveladas en cloroformo-metanol-agua 24:7:1 (por volumen), y secadas; las manchas son visualizadas al exponerlas a vapores de yodo. El aldehído monomérico es raspado de las placas, evaporando al yodo, el aldehído es extraído del polvo dentro de cloroformo-metanol 2:1 (v/v) y secado bajo nitrógeno. El rendimiento de la oxidación es de 25-40%. Después la reducción es con borotritiido de sodio y subsecuentemente completada con borohidrido de sodio, la galactosilesfingosina radiomarcada es purificada por cromatografía en capa fina. La migración es idéntica a la del compuesto original, y la cromatografía analítica en capa fina (20x20x0.025 cm) de un ácido hidrolizado (1 hr a 100°C

en HCl 4 N) revela que la galactosa residual contiene más del 92% de tritio y menos de 8% del total está presente en la esfingosina. El rango de actividad específica es de 1,600-5,700 cpm/nmol y el rendimiento total es de 20-30%.

Acilación:

El compuesto N-acil-beta-D(6-³H)galactosilesfingosina es preparado por la combinación directa de galactosilesfingosina radiomarcada unida a cadenas saturadas de ácidos grasos.

Ensayos:

Las mezclas de reacción contienen 30 nmol de N-acil-beta-D-(6-³H)galactosilesfingosina (27,000 cpm), 400 nmol de taurocolato de sodio, 80 nmol de ácido oléico y 10-25 microgramos de proteínas de células o tejidos en 100 microlitros de buffer citrato-fosfato a pH=4,3 (0.05 M de ácido cítrico por 0.1 M de fosfato ácido de sodio). El sustrato y detergentes se almacenan a -70°C en cloroformo-metanol 4:1 (v/v).

Lo anterior es secado bajo nitrógeno y sonicado (10 seg) en buffer anterior adicionando la fuente de enzima. Después de la incubación a 37°C por 1, 2 ó 16 hrs; la reacción termina por la adición de 100 microlitros de 3 mmol/lit de galactosa y puede ser 1.5 ml de cloroformo-metanol 2:1 (v/v) o 600 microlitros de suero albúmino humano al 1% (p/v) y 100 microlitros de ácido tricloroacético al 100% (p/v). La mezcla obtenida por cualquier procedimiento es centrifugada a 600 s durante 10 min. La (6-³H)galactosa es recuperada dentro de la fase superior acuosa, y después, es recuperada dentro de la fase sobrenadante posterior a la precipitación de sustrato no unido, la ceramida liberada y la albúmina [82, 91].

4. CONCLUSIONES.

- Se ha establecido que las esfingolipidosis son provocadas por almacén de lípidos dentro de lisosomas secundarios, debido principalmente a falta de actividad enzimática provocada por alteraciones a nivel genético, que predispone a los judíos para presentar dichas enfermedades.

- Para el estudio y diferenciación de las enfermedades causadas por acúmulo de lípidos se propone la siguiente secuencia, ya que por sintomatología únicamente no es posible establecer un diagnóstico satisfactorio:

1. Realización de Historia Clínica completa.
2. Realización de estudios de laboratorio de rutina tales como: determinación de colesterol, creatinina, fosfatasa ácida, bilirrubinas; así como análisis de sedimento urinario en donde se pueden aplicar ensayos de tinciones para diferenciar el tipo de lípidos almacenados.
3. Obtención de biopsia para la realización de diversas tinciones diferenciales (Tabla 7) y localizar la esfingolipodistrofia a que corresponde.
4. Obtención de enzima purificada del paciente para someterla a ensayo enzimático con el sustrato de elección para calcular el porcentaje de actividad de dicha enzima.
5. Una vez localizada la enfermedad a que corresponde, establecer el Tipo que se presenta, para posteriormente relacionarlo con el pronóstico y describir al paciente cómo será su evolución.
6. Aunque actualmente no se ha comprobado que exista una terapéutica eficiente, se podría intentar la administración de enzimas para el tratamiento.

- Estudios recientes, proponen que los ensayos enzimáticos deben realizarse en personas de procedencia judía que vayan a contraer matrimonio, pues de esta manera se puede evitar el nacimiento de más personas afectadas. Así como la detección de portadores.

- Lo que debe realizarse es la búsqueda de métodos terapéuticos eficientes para el control de la enfermedad, y prolongar la vida de aquellos pacientes que presentan períodos de vida muy cortos.

B I B L I O G R A F I A Y H E M E R O G R A F I A .

1. Aarden, L.A., and Oppenheim, J.J.: Revised nomenclature for antigen-non-specific T-cell proliferation and helper factors. *J. Immunol.* 123:2928-2929 (1979).
2. Barton, N.W., and Rosenberg, A.: Metabolism of glycosyl [3 H] ceramide by human skin fibroblasts from normal and glycosylceramidotic subjects. *J Biol Chem.* 250:3966 (1975).
3. Basu, S.K., Ho, Y.K., Brown, M.S., Bilheimer, D.W., Anderson, R.G.W., and Goldstein, J.L.: Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem.* 257:9785-9788 (1982).
4. Beeson, P.B. "Textbook of Medicine". 14a. ed. Cap XVI: Hematologic and Hematopoietic Disease". Edit. W.B. Saunders Company S.A. U.S.A. 1975; ----- pp. 1532-1535, 1859.
5. Benjamins, J., Omarnieri, M., Miller, K., Sonneborn, M., and McKhann, G.: Sulfatide synthesis in isolated oligodendroglial and neuronal cells. *J. Neurochem.* 23:751-757 (1974).
6. Beratis, N.G., Aaron, A.M., and Hirschhorn, K. Metachromatic leukodystrophy: Detection in serum. *J Pediatric.* 83:824-827 (1973).
7. Berzins, K., Blomberg, F., and Perlmann P.: Soluble and membrane-bound enzyme active antigens of rat-liver lysosomes. *Eur J Biochem.* 51:181-186 (1975).
8. Beutler, E., and Kuhl, W.: Purification and properties of human alpha-galactosidases. *J Biol Chem.* 247:7195-722 (1972).
9. Billings, A.A., Post, M., and Shapiro, C.M.: Febrile reaction of Gaucher's disease. *Med J.* September:242-252 (1973).
10. Blom, S., and Erikson, A.; Gaucher's disease Norrbottnian type. Neurodevelopmental, neurological and neurophysiological aspects. *Eur J Pediatr.* 140:316-322 (1983).
11. Brady, R.O.: Inherited metabolic diseases of the nervous system. *Science.* 193:733 (1976).
12. Brady, R.O., Gal, A.E., Kanfer, J.N., and Bradley, R.M.: The metabolic of glucocerebrosides. III. Purification and properties of a glucosyl- and galactosylceramide-cleaving enzyme from rat intestinal tissue. *J Biol Chem.* 240:3766-3769 (1965).

13. Brady, R.O., Kanfer, J.N., and Bradley, R.M.: Metabolism of glucocerebrosides. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 18:221-225 (1965).
14. Brady, R.O., Kanfer, J.N., and Shapiro, D.: The metabolism of Glucocerebroside. I. Purification and properties of a glucocerebroside-cleaving enzyme from spleen tissue. *J Biol Chem.* 240:39-43 (1965).
15. Braidman, I.: Characterization of human hexosaminidase C. *F.E.B.S. Lett.* 41:181-185 (1974).
16. Brondy, P.K., and Rosenberg, L.E. "Enfermedades del Metabolismo" 9Tomo I). Cap.V: Biosíntesis y catabolismo de lípidos; Cap. VII: Enfermedades del Metabolismo de Lípidos; Cap. IX: Esfingolipodistrofias. Ed. Salvat Editores S.A. Barcelona, España. 1979; pp. 180-205, 371-438, 485-504.
17. Brown, M.S., and Goldstein, J.L.: A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232:34-47 (1986).
18. Callahan, J.W., and Khalil, M.: Sphingomyelinases in human tissues. III. Expression of Niemann-Pick disease in cultured skin fibroblasts. *Pediatr Res.* 9:914-920 (1975).
19. Callahan, J.W., Khalil, M., and Gerrie, J.: Isoenzymes of sphingomyelinase and the genetic defect in Niemann-Pick disease Type C. *Biochem Biophys Res Commun.* 58:384-391 (1974).
20. Conradi, N.G., Kalimo, H., and Sourander, P.: Reactions of vessel walls and brain parenchyma to the accumulation of Gaucher cells in the Norrbottnian type (Type III) of Gaucher's disease. *Acta Neuropathol.* 75:385-390 (1988).
21. Conradi, N.G., Kalimo, H., Nilsson, O., Svennerholm, L., and Erikson, A.: Neuropathology of Norrbottnian type of Gaucher's disease. *Acta Neuropathol.* 65:99-109 (1984).
22. Curless, G.R.: Computed tomography of GM₁ gangliosidosis. *J Pediatr.* 105:964-966 (1984).
23. Davidsohn, I., and Henry, J.B. "Diagnóstico Clínico por el Laboratorio". - 6a. ed. Cap. XI: Química Clínica. Ed. Salvat Editores S.A. Barcelona, España. 1980; pp. 625-653.
24. Dawson, G., Matalon, R., and Doreman, A.: Glycosphingolipids in cultures - human fibroblasts. II. Characterization and metabolism in fibroblasts from patients with inborn errors of glycosphingolipids and mucopolysaccharide metabolism. *J Biol Chem.* 247:7951-7955 (1972).

25. Dean, R.T., Hylton, W., and Allison, A.C.: Lysosomal enzyme secretion by macrophages during intracellular storage of particles. *Biochem Biophys Acta*. 584:57-65 (1979).
26. Desnick, R.J., Allen, K.Y., Desnik, S.J., Raman, M.K., Bernlohr, R.W., and Krivit, W.: Enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes: Fabry's disease. *J Lab Clin Med*. 81:157-161 (1973).
27. Desnick, R.J., Dawson, G., Desnick, S.J., Sweeley, C.C., and Krivit, W.: Diagnosis of glycosphingolipidoses by urinary-sediment analysis. *N Engl J Med*. 284(14):739-744 (1971).
28. Desnick, R.J., Sweeley, C.C., and Krivit, W.: A method for the quantitative determination of neutral glycosphingolipids in urine sediment. *J Lipid Res*. 11:31-37 (1970).
29. Djaldetti, M., Pina, F., and Bessler, H.: The surface ultrastructure of Gaucher's cells. *Am J Clin Pathol*. 71:146-150 (1979).
30. Domarus, A.U. "Medicina Interna". (Tomo II). 5a. ed. Cap.: Metabolismo y Nutrición. Edit. Marín S.A. México. 1978; pp. 554-556.
31. Eto, Y., and Suzuki, K.: Brain sphingoglycolipids in Krabbe's globoid cell leukodystrophy. *J Neurochem*. 18:503-505 (1974).
32. Eto, Y., Wiesmann, U., and Herschkowitz, N.N.: Sulfogalactosylsphingosine sulfatase. Characteristics of the enzyme and its deficiency in metachromatic leukodystrophy in human cultured skin cultured skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 249:4955-4958 (1974).
33. Finelli, P.F.: Metachromatic Leucodystrophy manifesting as a Schizophrenic Disorder: Computed Tomographic Correlation. *Ann Neurol*. 18:94-95 (1985).
34. Forman, D.S., and Ledeen, R.W.: Axonal transport of gangliosides in goldfish optic nerve. *Science*. 177:630-635 (1972).
35. Fukuhara, N., Suzuki, M., Fujita, N., and Tsubaki, T.: Fabry's disease on the mechanism of the peripheral nerve involvement. *Acta Neuropathol*. 33:9-13 (1975).
36. Gal, A.E., Pentchev, P.G., and Fash, F.J.: A practical chromogenic procedure for the detection of homozygotes and heterozygous carriers of Niemann-Pick disease. *N Engl J Med*. 293:632-637 (1975).
37. Geri, I., Zigler, J.S. Jr., Brady, R.O., and Barranger, J.A.: Selective effects of glucocerebroside (Gaucher's storage material) on macrophage cell lines. *J Clin Invest*. 68:1182-1189 (1981).
38. Gilbert, H.S., Shankar, V., and Ginsberg, H.: 99m-technetium-low density

- lipoprotein distribution in patients with myeloproliferative disease: uptake by spleen and bone marrow. *Blood*. 68:198a (1986) Suppl I.
39. Goetting, M.G., and Dansouki, M.J.: Cerebral atrophy, macrosomias, and cutaneous telangiectasis in GM₁ gangliosidosis. *J Pediatr*. 107:644-645 (1985).
 40. Golde, D.W., and Scheider, E.L.: Pathogenesis the one variant of sea-blue hisiocytosis. *Lab Invest*. 33:371-377 (1975).
 41. Grafe, M., Thomas, C., Schneider, J., Katz, B., and Wiley, C.: Infantile - Gaucher's disease: A case with neuronal storage. *Ann Neurol*. 23:300-303 - (1988).
 42. Groth, C.G., and Hacenfeldt, I.: Splenic transplantation in a case of Gaucher's disease. *Lancet* I:1260 (1971).
 43. Haberland, C., Brunngraber, E., Willing, L., and Daniels, A.: Juvenil meta-chromatic leukodystrophy. Case report with clinical, histopathological ultra structural and biochemical observations. *Acta Neuropathol*. 26:93-98 (1973).
 44. Harper, A.H. "Manual de Química Fisiológica". 3a. ed. Cap. 20: Metabolismo de lípidos. Edit. El Manual Moderno. México. 1978; pp. 305-350.
 45. Harzen, K., and Benz, O.M.: A simple sphingomyelinase determination for - Niemann-Pick disease. Differential diagnosis of Type A, B and C. *J Neurochem*. 21:999-1004 (1973).
 46. Kampine, J.P., BRady, R.O., Kanfer, J.N., Feld, M., and Shapiro, D.: Diagnosis of Gaucher's disease and Niemann-Pick disease with small samples venous blood. *Science*. 155 (Sept):86-88 (1967).
 47. Kanfer, J.N., and Young, O.M.: The metabolism of sphingomyelin. I. Purification and properties of, a sphingomyelin-cleaving enzyme from rat liver tissue. *J Biol Chem*. 241:1081-1084 (1966).
 48. Kaye, E.M., Kolodny, E.H., Logigian, E.L., and Ullman, M.D.: Nervous system involvement in Fabry's disease: clicicopathological and biochemical correlation. *Ann Neurol*. 23:505-509 (1988).
 49. Kaye, E.M., Ullman, M.D., Wilson, E.R., and Barranger, J.A.: Type 2 and Type 3 Gaucher's disease: a morphological and biochemical study. *Ann Neurol*. 20:223-230 (1986).
 50. Kint, J.A.: Fabry's disease, alpha-galactosidase deficiency. *Science*. 167: 1268-1272 (1970).
 51. Kint, J.A., and Dacremont, G.: ABO blood groups and lysosomal diseases. - *N Engl J Med*. 285:121-128 (1971).
 52. Kobayashi, T., Shinoda, H., Goto, I., Yamanaka, T., and Suzuki, Y.: Globoid

- cell leukodystrophy is a generalized galactosylsphingosine (psychosine) - storage disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 144(1):41-46 (1987).
53. Kolata, G.: New understanding of Gaucher's disease. *Science.* 235(4794): -1328 (1987).
 54. Kolondy, E.H.: Properties of a particle-bound enzyme from rat intestine -- that cleaves sialic acid from Tay-Sachs ganglioside. *J Biol Chem.* 246:1426-1431 (1971).
 55. Koo, C., Innererity, T.L., and Mahley, R.W.: Obligatory role of cholesterol and apolipoprotein E in the formation of large cholesterol-enriched and receptor active high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 260:11934-11943 (1985).
 56. Krupp, A.M., and Milton, J.Ch. "Diagnóstico Clínico y Tratamiento". 23a. ed. Cap. 32: Genética Médica. Edit. El Manual Moderno. México. 1985; pp. 1043-1069.
 57. Kruth, H.S., Comly, M.E., Butler, J.D., Vanier, M.T., Fink, J.K., Wenger, D.A., Patel, S. and Pentchev, P.G.: Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. - *J Biol. Chem.* 261(35):16769-16774 (1986).
 58. Lehninger, A.L. "Bioquímica". 2a. ed. Cap. 11: Lípidos, lipoproteínas y - membranas. Cap. 24: Biosíntesis de los lípidos. Edit. Omega S.A. Barcelona, España. 1982; pp. 285-314, 671-703.
 59. Li, Y.T., Mazzotta, M.Y., Wan, C.C., Orth, R., and Li, S.C.: Structure of the major glucosamine containing ganglioside of human tissue. *J Biol Chem.* 248:2634-2639 (1973).
 60. Liscum, L., and Ferry, F.R.: Low density lipoprotein (LDL)-mediated suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick C fibroblasts. *J Biol Chem.* 262(35):17002-17007 (1987).
 61. Lott, I.T., Dulaney, J.T., Milunsky, A., Hoefnagel, D., and Moser, H.W.: Apparent biochemical homozygosity in two obligatory heterozygotes for metachromatic leukodystrophy. *J Pediatr.* 89:438-443 (1976).
 62. Lynch, M.J. "Métodos de Laboratorio" (Vol. I, II). 2a. ed. Edit. Nueva Editorial Interamericana S.A. México. 1987; pp. 355-482, 1311-1336.
 63. Malmqvist, E., Ivemark, B.L., Lindstein, J., Mousbach, A.B., and Martensson, E.: Pathologic lysosomes and increased urinary glycosylceramide excretion - in Fabry's disease. *Lab Invest.* 25:1-6 (1971).
 64. Malone, M.J.: A comparative study of myelin fractions from metachromatic - and globoid leukodystrophies. *Neurology.* 9:827-832 (1975).

65. Malone, M.J., Szuke, M.C., and Davis, D.A.: Globoid Leukodystrophy. II. Ultrastructure and chemical pathology. *Arch Neurol.* 32:613-615 (1975).
66. McDonough, J.F.: Gaucher's disease. *N Engl J Med.* 316(10):619-620 (1987).
67. Menkes, J.H., O'Brien, J.S., Okada, S., Grippo, J., Andres, J.M., and Cancilla, P.A.: Juvenile GM_2 gangliosidosis: biochemical and ultrastructural studies on a new variant of Tay-Sachs disease. *Arch Neurol.* 25:14-19 (1971).
68. Merz, B.: Matchmaking scheme solves Tay-Sachs problem. *JAMA.* 258(19):2636-2639 (1987).
69. Moffitt, K.D., Chambers, J.P., Diven, W.F., Glew, R.H., Wanger, D.A., and Farrell, D.F.: Characterization of lysosomal hydrolases that are elevated in Gaucher's disease. *Arch Biochem Biophys.* 190:247-260 (1978).
70. Naito, M., Takahashi, K., and Hojo, H.: An ultrastructural and experimental study on the development of tubular structures in the lysosomes of Gaucher's cells. *Lab Invest.* 58(5):590-598 (1988).
71. Navon, R., and Padeh, B.: Urinary test for identification of Tay-Sachs genotype. *J Pediatr.* 80:1026-1029 (1972).
72. Newburg, D.S., Yatziv, S., McCluer, R.H., and Raghaven, S.: Beta-glucosidase inhibition in murine peritoneal macrophages by conduritol-beta-epoxide: an in vitro model for Gaucher cell. *Biochem Biophys Acta.* 877:121-126(1986).
73. Nilsson, O., and Svennerholm, L.: Accumulation of glucosylsphingosine (ps₁ chosine) in cerebrum and cerebellum in an infantile and juvenile Gaucher's disease. *J Neurochem.* 39:709-718 (1982).
74. Norden, A.G.W., and O'Brien, J.S.: Ganglioside GM_1 beta-galactosidase: Studies in human liver and brain. *Arch Biochem Biophys.* 158:383-390 (1973).
75. Norden, A.G.W., Tennani, L.L., and O'Brien, J.S.: GM_1 ganglioside beta-galactosidase A: Purification and studies of the enzyme from human liver. — *J Biol Chem.* 249:7969-7971 (1974).
76. Norton, W.T., and Poduslo, S.E.: Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J Neurochem.* 21:757-759 (1973).
77. O'Brien, J.S.: Molecular genetics of GM_1 beta-galactosidase. *Clin Genet.* 8:303-306 (1975).
78. O'Brien, J.S., Okada, S., Chen, A., and Fillerup, D.L.: Tay-Sachs disease. Detection of heterozygotes and homozygotes by serum hexosaminidase assay. — *N Engl J Med.* 283:15-21 (1970).
79. O'Brien, J.S., Okada, S., Fillerup, D.L., Veath, M.L., Adornato, B., Brenner, P.H., and Leroy, L.: Tay-Sachs disease: Prenatal diagnosis. *Science.* 172:61-64 (1971).

80. Okada, S., and O'Brien, J.S.: Tay-Sachs disease. Generalized absence of a beta-D-N-acetylhexosaminidase component. *Science*. 165:698-702 (1969).
81. Orci, L., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Garcia, L.M.S., and Anderson, R.G.W.: Increase in membrane cholesterol: A possible trigger for degradation of HMG Co A reductase and crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells. *Cell*. 36:835-845 (1984).
82. Parvathy, M.R., Ben-Yaseph, Y., Mitchell, D.A., and Nadler, H.L.: Detection of Krabbe disease using tritiated galactosylceramides with medium-chain fatty acids. *Science*. 23:384-388 (1984).
83. Pennelli, N., Scaravilli, F., and Zucchello, F.: The morphogenesis of Gaucher cells investigated by electron microscopy. *Blood*. 34(3):331-116 (1969).
84. Pentchev, P.G., Comly, M.E., Kruth, H.S., Patel, S., Proestel, M., and Weintraub, H.: The cholesterol storage disorder of the mutant BALB/c mouse. *J Biol Chem*. 261(6):2772-2777 (1986).
85. Pentchev, P.G., Kruth, H.S., Comly, M.E., Butler, J.D., Vanier, M.T., Wenger, D.A., and Patel, S.: Type C Niemann-Pick disease. A parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low density lipoprotein-derived cholesterol in cultured fibroblasts. *J Biol Chem*. 261(35):16775-16780 (1986).
86. Percy, A.K., and Kaback, M.M.: Metachromatic Leukodystrophy: Diagnosis with samples of venous blood. *Science*. 161:594-595 (1968).
87. Petersdorf, N., Scaravilli, F., and Zucchello, F.: "Principios de Medicina Interna". 10a. ed. Cap. 104: Enfermedades Lisos6micas por dep6sito. Edit. Mc Graw Hill. M6xico. 1985; pp.771-784.
88. Polliack, A.: Surface features of normal and leukemic lymphocyte as seen by scanning electron microscopy. *Clin Immunol Immunopathol*. 3:412-430 (1975).
89. Renkonen, O.: Enrichment of gangliosides in plasma membranes of hamster kidney fibroblasts. *Acta Chem Scand*. 24:731-735 (1970).
90. Schneider, E.I., Brady, R.O., McColloch, J.R., and Eistein, C.J.: Prenatal Niemann-Pick disease. Biochemical and histologic examination of a 19 gestational week fetus. *Pediatr Res*. 6:720-724 (1972).
91. Singer, H.S., and Schafer, I.A.: White cell beta-galactosidase activity. *N Engl J Med*. 282:571-574 (1970).
92. Sloan, H.R., Uhlendorf, B.W., Kanfer, J.N., Brady, R.O., and Fredrickson, D.S.: Deficiency of sphingomyelin-cleaving enzyme activity in tissue cultures derived from patients with Niemann-Pick disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 34:582-588 (1969).

93. Smith, K.A., Gilbride, K.J., and Favata, M.F.: Lymphocyte activating factor promotes T-cell growth factor production by cloned murine lymphoma cells. - *Nature*. 287:853-855 (1980).
94. Snyder, P.D., Desnick, R.J., and Krivith, W.: The glycosphingolipids and - glycosyl hidrolases of human blood platelets. *Biochem Biophys Res Commun.*- 46:1857-1861 (1972).
95. Sokol, J., Blanchette, J., Kruth, H.S., Dwyer, N.K., Amande, L.M., Butler, - J.D., Robinson, E., Patel, S., Brady, R.O., Comly, M.E., Vanier, M.T., and
96. Pentchev, P.G.: Type C Niemann-Pick disease. Lissosomal accumulation and de- fective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol.- *J Biol Chem.* 263(7):3411-3417 (1988).
96. Stahl, P., Schlesinger, P.H., Sigardson, E., Rodman, J.S., and Lee, Y.C.: - Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: -- characterization and evidence for receptor recycling. *Cell*. 19:207-215 --- (1980).
97. Stanbury, J.B. "The matabolic of inherited disease". 5a. ed. Part 4: Di- sorders characterized by evidence of abnormal lipid metabolic. Edit. Mc - Graw Hill. New York. 1985; pp. 493-853.
98. Stein, J.H. "Medicina Interna". (Tomo II). Cap. IV: Enfermedades metabólicas y endócrinas específicas. Edit. Salvat Editores S.A. Barcelona, España. 1983; pp. 1997-2007.
99. Suzuki, K., and Grover, W.D.: Krabbe's Leukodystrophy (globoid cell leuko- dystrophy). An ultrastructural study. *Arch Neurol.* 22:385-388 (1970).
100. Suzuki, Y., and Suzuki, K.: Deficiencie of galactocerebrosidase in serum, leukocytes and fibroblasts. *Science.* 171:73-77 (1971).
101. Szokr, M.: A comparative study of myelin reactions from metachromatic and globoid leukodystrophies. *Neurology.* 25:827-831 (1975).
102. Tabira, T.: Case records of the Massachusetts General Hospital: Case 2. -- 310:106-114 (1984).
103. Tabira, T., Goto, I., Kuroiwa, Y., and Kikuchi, M.: Neuropathological and - biochemical studies in Fabry's disease. *Acta Neuropathol.* 30:345-349 - (1974).
104. Tallman, J.F.: Enzimatic activities associed with membranous cytoplasmic - bodies and isolated brain lysosomes. *J Neurochem.* 18:1775-1777 (1971).
105. Tallman, J.F., Brady, R.O., and Suzuki, K.: Enzymatic activities associed with membranous cytoplasmic bodies isolated brain lysosomes. *J Neurochem.* - 18:1775-17780 (1975).

106. Tanaka, A., Ohno, K., and Suzuki, K.: GM_2 gangliosidosis B_1 variant: a wide geographic and ethnic distribution of the specific beta-hexosaminidase alpha-chain mutation originally identified in a Puerto Rican patient. *Biochem Biophys Res Commun.* 156(2):1015-1019 (1988).
107. Thomas, G.H.: beta-D-galactosidase in human urine: Deficiency in generalized gangliosidosis. *J Lab Clin Med.* 74:725-728 (1969).
108. Uliman, M.D., and Radin, N.S.: Enzymatic formation of hydroxy ceramides and comparison with enzymes forming nonhydroxy ceramides. *Arch Biochem Biophys.* 152:767-771 (1972).
109. Waltz, G., Harik, S.I., and Kaufman, B.: Adult Metachromatic Leukodystrophy. Value of computed tomographic scanning and magnetic resonance imaging of the brain. *Arch Neurol.* 44:225-227 (1987).
110. Weigandt, H.: Monosialo-lactosylhexaosyl-ceramide: A ganglioside from human spleen. *Eur J Biochem.* 45:367-370 (1974).
111. Wenger, D.A., Sattler, M., and Markey, S.P.: Deficiency of monogalactosyl-diglyceride beta-galactosidase activity in Krabbe's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 53:630-636 (1973).
112. Wherret, J.R.: Characterization of the major ganglioside in human red cells and of a related tetrahexosylceramide in white cells. *Biochem Biophys Acta.* 326(63):456-462 (1972).
113. Wolfe, L.S., Senior, R.G., and Ying-King, N.G.: The structures of oligosaccharides accumulating in the liver of GM_1 -gangliosidosis Type I. *J Biol Chem.* 249:1828-1831 (1974).
114. Wood, S., and Nadler, H.L.: Fabry's disease. Absence of alpha-galactosidase isoenzyme. *Am J Hum Genet.* 24:250-253 (1972).
115. Yatziv, S., Newburg, D.S., Levni, N., Barfi, G., and Kolodny, E.H.: Gaucher-like changes in human blood-derived macrophages induced by beta-glucocerebrosidase inhibition. *J Lab Clin Med.* (April) 111:416-420 (1988).
116. Yunis, E.J., and Lee, R.E.: Tubules of globoid leukodystrophy. A right-handed helix. *Science.* 169:64-68 (1970).