



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Optimización de la determinación de la actividad de la enzima Beta-Glucosidasa ácida en gota de sangre seca y su comparación con la actividad de la misma, en extracto de leucocitos en pacientes con enfermedad de Gaucher

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biotecnología

2018

Autora:

María Roy Guerra

Directores:

Dra. María Pilar Irún Irún

Jorge J. Cebolla Sanz

Lugar de realización:

Unidad de Investigación Traslacional, Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza

Doña María Pilar Irún Irún y Don Jorge Javier Cebolla Sanz, investigadores del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón

CERTIFICAN

Que el Trabajo de Fin de Grado titulado “Optimización de la determinación de la actividad de la enzima Beta-Glucosidasa ácida en gota de sangre seca y su comparación con la actividad de la misma en extracto de leucocitos en pacientes con enfermedad de Gaucher”, presentado por María Roy Guerra, ha sido realizado bajo su dirección en la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza y reúne los requisitos para ser presentado por su autora.

Zaragoza, a 26 de Junio de 2018.

Agradecimientos

La realización de este Trabajo de Fin de Grado ha supuesto un intenso periodo de aprendizaje, por lo que me gustaría agradecer a todas las personas que han colaborado en él. En primer lugar, a mis directores, Pilar Irún Irún y Jorge Cebolla Sanz, por su confianza y dedicación, sin las cuales no hubiera podido completar mi trabajo satisfactoriamente. A Carlos Lahoz Gil, por sus buenos y acertados consejos y por brindarme su ayuda siempre que era necesario. Y a mis padres, por su apoyo y comprensión incondicionales, y por haber estado siempre ahí para mí.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Historia	2
2.2. Etiopatogenia	2
2.2.1 Implicaciones hematológicas, viscerales y óseas	3
2.2.2 Base genética	4
2.3. Clasificación y sintomatología	5
2.4. Prevalencia	5
2.5. Biomarcadores	5
2.6. Diagnóstico	6
2.7. Tratamiento	7
3. OBJETIVO	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1. Población de estudio	7
4.2. Especímenes biológicos	8
4.2.1. Tarjetas tipo Guthrie	8
4.2.2. Aislamiento de Leucocitos	8
4.3. Actividad β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca	9
4.3.1. Optimización del método	9
4.3.2. Cinética enzimática	10
4.3.3. Aseguramiento de la estabilidad pre-analítica	10
4.3.4. Control de calidad	10
4.4. Actividad β -glucosidasa ácida en extracto leucocitario	11
4.5. Análisis estadístico	11
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
5.1. Población de estudio	12
5.2. Método optimizado para el análisis de β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca	12
5.3. Descripción del método	14

5.4.	Evaluación de la sensibilidad, especificidad y punto de corte de la actividad de β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca	15
5.5.	Control de calidad	16
5.6.	Estabilidad	17
5.7.	Actividad de β -glucosidasa ácida en leucocitos	18
5.8.	Actividad β -glucosidasa ácida leucocitos vs gota de sangre seca	18
6.	CONCLUSIONES	19
7.	BIBLIOGRAFÍA	20

Índice de tablas

Tabla 1.	Reactivos y condiciones en las publicaciones de referencia consultadas	9
Tabla 2.	Datos demográficos de la población de estudio	12
Tabla 3.	Sensibilidad de la detección fluorimétrica	14
Tabla 4.	Condiciones optimizadas de las variables metodológicas del ensayo enzimático	14
Tabla 5.	Actividad de la β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca	15
Tabla 6.	Variabilidad interensayo de la actividad β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca	16
Tabla 7.	Actividad de la β -glucosidasa ácida en extracto leucocitario	18

Índice de figuras

Figura 1.	Catabolismo lisosomal de los glucoesfingolípidos	2
Figura 2.	Reacción catalizada por la β -glucosidasa ácida	3
Figura 3.	Célula de Gaucher	3
Figura 4.	Estructura del Gen <i>GBA</i>	4
Figura 5.	Frecuencia de las variantes genéticas patogénicas del gen <i>GBA</i>	4
Figura 6.	Representación esquemática de la reacción <i>in vitro</i> catalizada por la β -glucosidasa ácida	6

Figura 7. Variación de la actividad enzimática en las pruebas de optimización	13
Figura 8. Curva de cinética enzimática	13
Figura 9. Diagrama de dispersión de la β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca	14
Figura 10. Curva característica operativa del receptor	15
Figura 11. Estabilidad pre-analítica de la actividad de la β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca	17
Figura 12. Diagrama de dispersión de la β -glucosidasa ácida en extracto leucocitario	18
Figura 13. Actividad de la β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca vs extracto leucocitario	19

Índice de enlaces web

American Society of Hematology, Image Bank: <https://imagebank.hematology.org/>

Ensembl: www.ensembl.org

Human Gene Mutation Database: www.hgmd.cf.ac.uk

National Center for Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov

Listado de abreviaturas

λ	Longitud de onda
4-MU	4-metilumbeliferona
CG	Células de Gaucher
COR	Característica operativa del receptor
DBS	Dried blood spot
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EG	Enfermedad de Gaucher

FEETEG	Fundación Española para el Estudio y Tratamiento de la Enfermedad de Gaucher y otras lisosomales
GD	Gaucher disease
GC	β -glucosidasa ácida
Kb	Kilobase
m/v	Masa/volumen
QT	Quitotriosidasa
TSE	Terapia de sustitución enzimática
TRS	Terapia de reducción de sustrato
URF	Unidades relativas de fluorescencia
v/v	Volumen/volumen

1. RESUMEN

La enfermedad de Gaucher (EG) es un error innato del metabolismo lisosomal caracterizado por el depósito de glucosilceramida en este orgánulo y que se corresponde con una actividad reducida-nula de la enzima β -glucosidasa ácida (GC). El acúmulo de glucosilceramida en las células del sistema fagocítico mononuclear es el principal responsable de los signos y síntomas propios de la enfermedad. Con el presente trabajo se persigue la optimización y validación de un método de detección de potenciales afectos de EG partir de muestras de gota de sangre seca (GSS). Para ello, se estudió el efecto de las siguientes variables sobre la actividad enzimática: composición del tampón de elución, cantidad de muestra a ensayar, tiempo de incubación y sensibilidad del sistema de detección fluorimétrico. A continuación, se ensayaron, siguiendo el procedimiento optimizado, 85 muestras, distribuidas en 18 afectos de EG, 22 portadores y 45 controles. Mediante una curva característica operativa del receptor (COR) se determinó un 95% de sensibilidad y 100% de especificidad para el método, así como un valor de corte de 2,06 $\mu\text{mol/L}$ sangre/h, por encima del cual los individuos se consideran potencialmente no compatibles con la EG. Finalmente, se ensayó la actividad GC en extracto leucocitario, lo que permitió comprobar que existía una buena correlación entre ambos métodos ($\rho=0,72$), aportando fiabilidad al nuevo procedimiento. No obstante, al tratarse de un método de cribado, las muestras que no alcancen el valor de corte establecido deberán ser sometidas a un diagnóstico confirmatorio mediante el análisis de la actividad enzimática en extracto leucocitario.

ABSTRACT

Gaucher disease (GD) is an inborn error of lysosomal metabolism characterized by glucosylceramide build-up in this organelle, which corresponds with a reduced-null activity of the enzyme acid β -glucosidase. This glucosylceramide accumulation in the mononuclear phagocyte system is the main cause for the signs and symptoms of the disease. The aim of this work was the optimization and validation of a new method to detect potential patients of GD in dried blood spot (DBS) samples. To that end, the effect of the following variables related to the enzymatic activity, were studied: elution buffer composition, amount of sample (DBS), incubation time and fluorometric detection system sensibility. Once optimized the protocol, 85 samples including 18 patients affected of GD, 22 carriers and 45 healthy controls, were analyzed. A sensitivity of 95%, specificity of 100%, and cut-off value of 2,06 $\mu\text{mole/L}$ blood/h, above which individuals are classified as potentially non-compatible with GD, were determined by a receiver operating characteristic curve. Finally, enzyme activity of the same patients was tested in leukocyte extract and a good correlation between both methods was found, supporting the new procedure. However, due to its role as a screening test, samples under the cut-off value should be re-analyzed by measurement of acid β -glucosidase activity in leukocytes.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. HISTORIA

La enfermedad de Gaucher (EG) debe su nombre al médico francés Philippe Charles Ernest Gaucher, quién, en 1882, encontró infiltración del parénquima por unas células grandes de aspecto espumoso en la necropsia de una mujer joven fallecida por caquexia y esplenomegalia, diagnosticada erróneamente como un epiteloma primitivo del bazo. Sería posteriormente, en 1885, al aparecer un caso similar, cuando la enfermedad recibió su nombre actual. Posteriormente, se hicieron muchas suposiciones sobre cuál podía ser la causa de la enfermedad, entre las que destacan una posible toxina sistémica o procesos inflamatorios entre otras¹. Finalmente, en 1905, Brill² sugirió que se trataba de una enfermedad de carácter genético que implicaba el bazo, el hígado y la médula ósea. En 1934 Aghion³ identifica el glucocerebrósido como el material acumulado, años más tarde Brady (1965)⁴ demostró que era causado por déficit del enzima GC y posteriormente Horowitz (1989)⁵ describió la estructura gen causal y del pseudogén.

2.2. ETIOPATOGENIA

La principal causa de esta enfermedad es el depósito de un tipo de glucocerebrósido, debido a la deficiencia del enzima lisosomal β -glucocerebrosidasa, β -glucosidasa ácida o glucosilceramida (GC, EC 3.2.1.45), clave en una de las últimas etapas en la ruta de degradación de los glucoesfingolípidos

complejos (Figura 1), moléculas presentes en las membranas celulares, implicadas en el reconocimiento celular, así como en las respuestas proliferativas y apoptóticas⁶, y producidas principalmente, en los procesos de eliminación de células sanguíneas⁷ por los macrófagos⁸.



Figura 1. Catabolismo lisosomal de los glucoesfingolípidos. Indicado en rojo la reacción enzimática responsable de la enfermedad de Gaucher. Adaptado de Jay García, et al.

La GC actúa como catalizador en la reacción de hidrólisis de la glucosilceramida, generando como productos de la reacción glucosa y ceramida. (Figura 2).

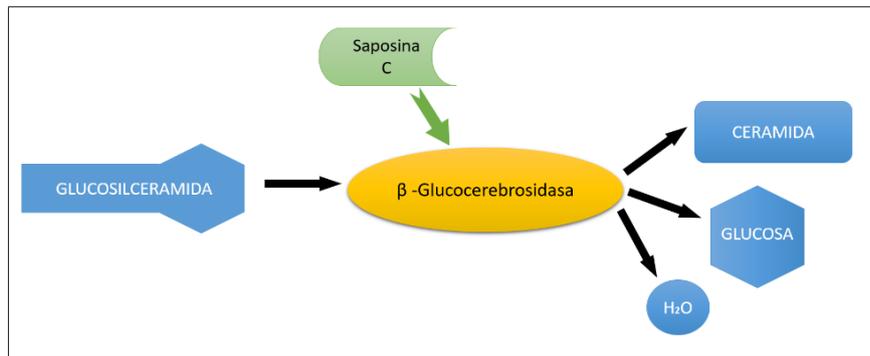


Figura 2. Reacción catalizada por la β -glucosidasa ácida. La proteína saposina C actúa como activador de la enzima para que ésta lleve a cabo su rol catalítico.

Defectos catalíticos del centro activo, desregulación de la expresión proteica o falta de interacción con los activadores enzimáticos conllevan un depósito del sustrato de la reacción en el lumen de los lisosomas de los macrófagos principalmente, formándose agregados en su interior que confieren a la célula un aspecto espumoso o de “papel arrugado”, visible mediante tinción con May-Grünwald-Giemsa por microscopía óptica (Figura 3), denominándose “células de Gaucher (CG)”^{8,9}.

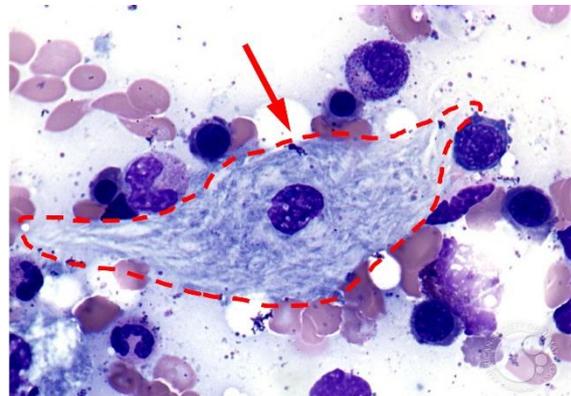


Figura 3. Célula de Gaucher. Citoplasma con el característico aspecto de papel arrugado debido a la acumulación de glucosilceramida. Adaptado de: American Society of Hematology, <https://imagebank.hematology.org/>

2.2.1. Implicaciones hematológicas, viscerales y óseas

La eliminación de hematíes y leucocitos envejecidos es llevada a cabo por el sistema fagocítico mononuclear; por lo que el acúmulo de glucosilceramida será más destacable en aquellos tejidos en los que su presencia sea mayor. De esta forma, se producirá una infiltración de las CG en la médula ósea, bazo e hígado principalmente, aunque también en otros órganos, originando las manifestaciones de la enfermedad⁸. Sus síntomas dependerán del lugar y la rapidez del acúmulo, determinado por el grado de retención de la misma en el retículo endoplasmático y su degradación en el proteosoma⁶.

En la medula ósea, el desplazamiento del tejido hematopoyético por las CG infiltradas, reduce la génesis de células sanguíneas. Además, el aumento del tamaño del bazo (esplenomegalia) aumenta la actividad del mismo, contribuyendo

a la desaparición temprana de dichas células, causando citopenias generalizadas (anemia, trombocitopenia y, menos frecuentemente, leucopenia)^{10,11}.

La infiltración visceral da lugar a esplenomegalia en un 95% de los casos y hepatomegalia en el 80%, presentándose generalmente de manera conjunta¹². Por otro lado, como consecuencia del acúmulo de CG, aparecen complicaciones óseas (80% de los pacientes), siendo el factor más incapacitante de la enfermedad, que pueden incluir: dolor crónico o agudo en forma de crisis óseas, osteopenia, osteonecrosis (cabeza femoral principalmente y zona proximal de húmero y tibia en ocasiones), osteoporosis, lesiones osteolíticas y más raramente osteomielitis aguda¹³.

2.2.2. Base genética

La enfermedad está causada en la mayoría de los casos por mutaciones en el gen *GBA*, que codifica para la enzima GC. Este gen se localiza en la región q21 del cromosoma 1, y consta de dos regiones reguladoras de la expresión en posición 5' y 3', 11 exones y 10 intrones (Figura 4). La heterogeneidad de las variantes genéticas de significado patológico y la frecuencia de aparición en *GBA*, quedan recogidos en la Figura 5.



Figura 4. Estructura de gen *GBA*. Gen compuesto por dos zonas reguladoras no traducidas en 5' y 3', 11 exones y 10 intrones. Figura no escalada. Fuente: www.ensembl.org.

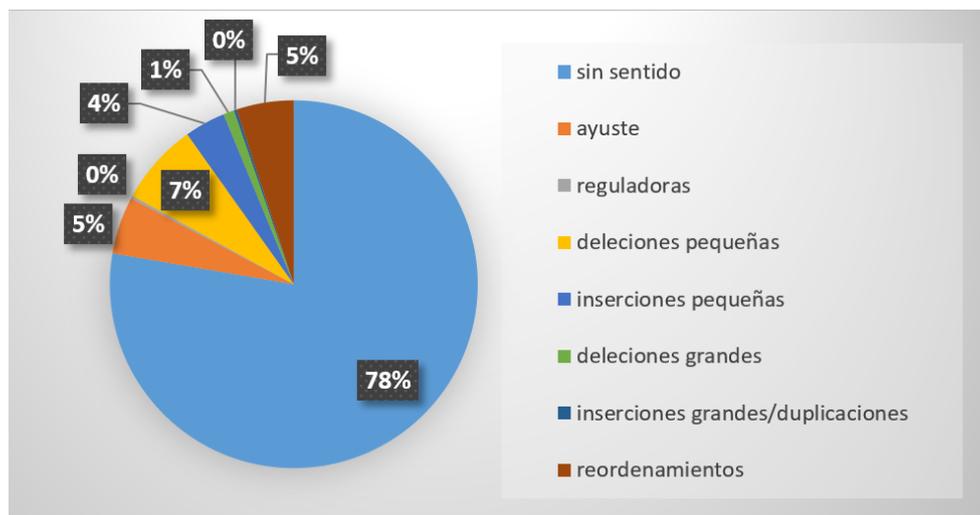


Figura 5. Frecuencia de las variantes genéticas patológicas del gen *GBA*. Existen más de 400 mutaciones diferentes recogidas en el Human Gene Mutation Database de la Universidad de Cardiff. Fuente: www.hgmd.cf.ac.uk.

A 16 kb del extremo 3' del gen funcional se localiza un pseudogén, que presenta una homología del 96% con el gen estructural⁵ y un tamaño inferior debido, por un lado, a deleciones en los intrones 2, 4, 6 y 7, correspondientes a elementos Alu, y a

una delección de 55 pb en el exón 9. Su presencia complica la identificación y caracterización de mutaciones en el gen *GBA* a la hora de realizar el diagnóstico genético.

Más raramente, la EG puede estar causada por un déficit de la proteína saposina C, activadora de la GC (ver Figura 2)¹⁴, codificada por el gen *PSAP*, localizado en la región q22.1 del cromosoma 10, dando lugar a un precursor proteico denominado prosaposina, a partir del cual se generan las formas activas de la proteína (saposinas A, B, C y D) mediante procesamiento proteolítico post-traduccional del precursor mencionado.

2.3. CLASIFICACIÓN Y SINTOMATOLOGÍA

Actualmente la EG es considerada como un continuo desde los fenotipos asintomáticos hasta las formas letales, pero clásicamente se han diferenciado tres formas principales: El tipo 1, el más frecuente y menos grave de ellos, caracterizado por hepatoesplenomegalia, anomalías hematológicas y afectación esquelética, pero sin afectación neurológica. El tipo 2, menos frecuente y más agresivo, con presentación en los primeros meses de vida, caracterizándose por una pronunciada hepatoesplenomegalia y severas manifestaciones neurológicas, falleciendo antes de los 2 años. El tipo 3, al igual que el anterior, se manifiesta durante la niñez o juventud, pero es menos grave, e incluye manifestaciones neurológicas de desarrollo más lento y progresivo, y trastornos hematológicos y esqueléticos¹².

2.4. PREVALENCIA

La EG afecta a hombres y mujeres por igual, siendo el tipo 1 el más frecuente (94% de los casos). La prevalencia postulada de la EG es de 1/100.000 nacidos vivos, por lo que es considerada una enfermedad rara, a excepción de en población judía Ashkenazi, donde la prevalencia es de 1/850¹⁵. Existe también una frecuencia mayor en la región Norrbotten (Suecia), donde tiene una prevalencia de 1/50.000, según National Organization for Rare Disorders.

En España, se registran hasta la fecha 405 pacientes, según datos de la Fundación Española para el Estudio y Tratamiento de la Enfermedad de Gaucher y otras lisosomales (FEETEG), siendo Aragón la quinta comunidad autónoma con mayor prevalencia de nuestro país (7,5%).

2.5. BIOMARCADORES

Los biomarcadores son moléculas indicadoras de procesos fisiológicos, normales o patológicos, que pueden ser medidas y evaluadas tanto para realizar el diagnóstico de enfermedades, como para monitorizar la respuesta al tratamiento¹⁶.

En EG, los más utilizados son la enzima quitotriosidasa (QT) y la citocina CCL18/PARC^{17,18}. Estos biomarcadores se elevan, por ejemplo, en procesos

inflamatorios inespecíficos, siendo sus niveles en la EG especialmente elevados en contraste con otras patologías.

Se han propuesto otros biomarcadores como ferritina total, ferritina glicosilada, transferrina, enzima convertidora de angiotensina, fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), etc. siendo todos ellos menos específicos y sensibles que la QT y la concentración de CCL18/PARC.

Más recientemente, se ha identificado un biomarcador más sensible y específico para la EG, la concentración de glucosilesfingosina¹⁹. Este biomarcador procede de la reacción de deacilación de la glucosilceramida, sustrato acumulado en la EG.

2.6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico diferencial de la enfermedad implica demostrar la reducida actividad enzimática de la GC en extractos celulares. Se han aplicado diferentes metodologías *in vitro*, siendo una de las más sensibles y más ampliamente utilizadas el uso de 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido, análogo estructural del sustrato de la enzima modificado covalentemente con una molécula reportera, para detectar la actividad enzimática presente en el extracto celular (Figura 6). *In vitro*, se reproducirán las condiciones de reacción fisiológicas del lisosoma (pH 5, 37°C) y en presencia de taurocolato sódico como activador, se producirá la hidrólisis enzimática del sustrato artificial, liberándose la molécula reportera, 4-metilumbeliferona (4-MU), detectable mediante espectrofluorimetría ($\lambda_{\text{excitación}}=366$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=446$ nm). La concentración de 4-MU liberada en la reacción será proporcional a los moles de sustrato procesados por la enzima en una unidad de tiempo determinada²⁰.

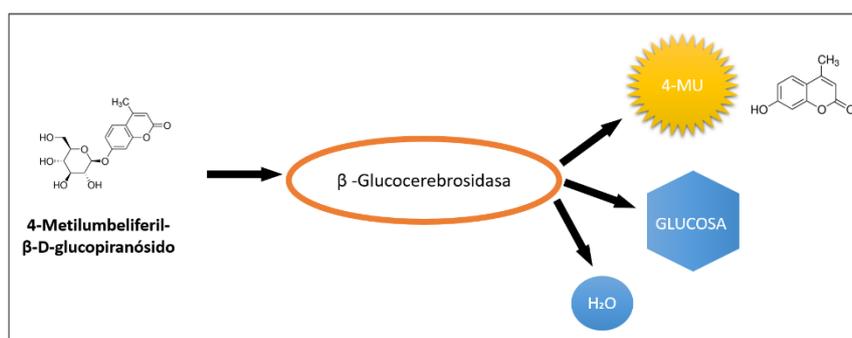


Figura 6. Representación esquemática de la reacción *in vitro* catalizada por la β -glucosidasa ácida. El producto fluorogénico 4-MU nos permite medir el proceso de catálisis enzimática.

Una vez constatado el déficit enzimático, debe procederse a identificar la variante genética en el gen *GBA* que causa el menoscabo enzimático. Se conocen más de 400 variantes genéticas patogénicas relacionadas con la EG. En España, se han detectado 66 distintas, representado sólo dos de ellas (p.Asn409Ser y p.Leu483Pro, NP_000148 [www.ncbi.nlm.nih.gov]) el 70% de la totalidad de los alelos identificados. Es por esta razón, a la hora de realizar el diagnóstico genético

en nuestra población, se recomienda genotipar primero estas variantes. En caso de no completar con ellas el genotipo del paciente, se procederá a realizar la secuenciación de las regiones reguladoras y codificantes del gen²¹.

Existe una aproximación, de gran utilidad a la hora de realizar un cribado de los pacientes, pero que no constituye una técnica de diagnóstico en sí, ya que tiene que ser confirmada por análisis genético o por medida de la actividad en extracto celular: la determinación de la actividad enzimática en gota de sangre seca (GSS).

2.7. TRATAMIENTO

En la actualidad, existen dos realidades terapéuticas en la EG, la terapia de sustitución enzimática (TSE) y la de reducción de sustrato (TRS).

La TSE se basa en la administración exógena de la enzima recombinante activa generada en modelos mamíferos o vegetales. Actualmente, existen tres enzimas recombinantes disponibles: la imiglucerasa, la velaglucerasa y la taliglucerasa.

El TRS consiste en la administración de un inhibidor selectivo de la glucosilceramidasintasa, enzima que sintetiza la glucosilceramida siendo el sustrato de la GC. Se administra de forma oral, y a diferencia de la TSE, puede atravesar la barrera hematoencefálica o llegar a lugares con poca vascularización como el hueso. Miglustat o Eliglustat son los dos fármacos disponibles en el mercado para este tipo de tratamiento²².

Existen otros tratamientos alternativos al TSE y TRS: la terapia génica, el trasplante de células madre hematopoyéticas y el uso de chaperonas farmacológicas. Sin embargo, a pesar de los numerosos intentos, aún no se ha conseguido que ninguno de ellos proporcione los resultados esperados.

3. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es optimizar un nuevo método de cribado de potenciales pacientes de la EG basado en la determinación de la actividad enzimática de la GC en un soporte ampliamente utilizado en cribados bioquímicos poblacionales como es la sangre seca sobre un papel de filtro.

Como objetivo secundario, se comparará el método de cribado en GSS optimizado con el método de diagnóstico enzimático de referencia para la EG.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este trabajo se incluyeron de forma retrospectiva (septiembre 2015 - enero 2018) y prospectiva (febrero 2018 - mayo 2018) individuos categorizados genéticamente como afectados de EG, portadores de un alelo patogénico para la EG provenientes del estudio familiar, así como individuos control sanos.

Todos los participantes del estudio autorizaron el uso de los excedentes de las fracciones biológicas empleadas en el proceso diagnóstico, para fines de investigación mediante la firma del pertinente consentimiento informado depositado en el Registro Español para la Enfermedad de Gaucher gestionado por la FEETEG sito en Zaragoza.

Este estudio se desarrolló de acuerdo con los principios recogidos por la Asociación Médica Mundial en la Declaración de Helsinki, Finlandia, de 1964 y enmendado en la conferencia de Fortaleza, Brasil, de 2013.

4.2. ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

Se recogió, mediante punción intravenosa, sangre total periférica anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El mismo día de la recepción de la muestra se dispuso la sangre en las tarjetas de papel de filtro tipo Guthrie y se procedió al aislamiento de las fracciones plasmática y celular leucocitaria.

4.2.1. Tarjetas tipo Guthrie

El almacenamiento de la sangre en este tipo de tarjetas permite su conservación durante largos periodos de tiempo. Elaboradas con celulosa y algodón, contienen una serie de sustancias químicas que lisan las células, precipitando las proteínas y protegiendo el DNA, disminuyendo así el riesgo de contaminación de la muestra. Se dispensaron 35µL de sangre por área circular en tarjetas Whatman® 903, dejándose secar 24 horas a temperatura y humedad relativa controladas. Posteriormente se almacenaron en bolsas de plástico con cierre hermético junto con material desecante a -20°C en una cámara congeladora (12339, Koxka Zaragoza) hasta su ensayo.

4.2.2. Aislamiento de leucocitos

La obtención de leucocitos a partir de sangre total periférica con EDTA se realizó siguiendo el protocolo indicado a continuación. En una jeringuilla de 20mL, se aspiraron 5mL de dextrano 3% [masa/volumen (m/v), obtenido a partir de *Leuconostoc spp*, Sigma®] en solución salina isotónica de NaCl 0,9mg/mL (m/v, Meinsol®) y 14mL de sangre; se homogenizó y se dejó decantar mediante gravimetría durante 2 horas. El dextrano es un polisacárido ramificado que permite la separación de las células en base a su tamaño gracias a la formación de una red tridimensional de entre 450.000 y 600.000 kDa. Posteriormente se recogió la fase superior donde se encuentran las células de la serie blanca y se centrifugó a 2000g durante 10 minutos (5702, Eppendorf) para precipitar las células y resuspenderlas en 1mL de medio salino; se añadieron 5mL de NH₄Cl 0,83% (m/v, Sigma®) y se dejó actuar a temperatura ambiente durante 10 minutos, con el objetivo de lisar los hematíes restantes. Para finalizar el proceso, se volvió a centrifugar a 2000g durante 10 minutos, obteniéndose un precipitado de leucocitos que se resuspendió en 3mL de medio salino y se alicuotó en otros tantos microtubos

de ensayo de 1,5mL. Finalmente, se centrifugaron los tubos a 9000g durante 30 segundos (Spectrafuge 24D, Labnet), se descartó el sobrenadante y se almacenaron temporalmente hasta su ensayo los precipitados de leucocitos a -20°C en una cámara congeladora (12339, Koxka Zaragoza).

4.3. ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA ÁCIDA EN GOTA DE SANGRE SECA

4.3.1. Optimización del método

Se revisaron los procedimientos utilizados en algunos artículos publicados anteriormente, los cuales quedan recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos y condiciones en las publicaciones de referencia consultadas

Artículo	Discos de 3mm	Tampón de elución	Sustrato	Tiempo de incubación/T ^º	Tampón de parada
Kang et al. ²³	1	CP 0,2M (pH=5,2) + TDC 0,9% + Triton X-100 0,15%	4-MU β GLU 5mM	20h/37°C	GC 0,17M (pH=10,5)
Verma et al. ²⁴	1	CP 0,4M (pH=5,5) + TC 0,2% (pH=5,5)	4-MU β GLU 5mM	5h/37°C	EDA 0,3M
Chamoles et al. ²⁵	1	TDC 0,75%(w/v) + CP 0,4M (pH=5,2)	4-MU β GLU 0,02M	20h/37°C	EDA 0,13M (pH=11,3)
Aldemir et al. ²⁶	2	TDC (pH=4,4)	4-MU β GLU 20mM	20h/37°C	EDA 0,1M
Uribe et al. ²⁷	1	CP 0,3M (pH=5) + TDC 1% + C β E 0.5mM	4-MU β GLU 20mM	24h/37°C	GC 0,17M (pH=10)

CP: Citrato-fosfato; TDC: Taurodeoxicolato; 4-MU β GLU: 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido; GC: glicina-carbonato; TC: Taurocolato; EDA: etilendiamina; C β E: conuritól- β -epóxido.

Tras la revisión de la literatura, se procedió a optimizar diversas variables: En primer lugar, se valoró la utilización para la elución de los discos impregnados en sangre de tampón taurocolato sódico 3,6% (m/v) + Tritón X-100 0,6% [volumen/volumen (v/v)] y tampón taurodeoxicolato sódico 3,6% (m/v) + Tritón X-100 0,6% (v/v). Una vez establecido el mejor tampón de elución se determinó el tiempo óptimo de incubación de la reacción mediante parametrización de cinética enzimática utilizando muestras de controles sanos. En tercer lugar, se optimizó la cantidad de muestra, realizando ensayos eluyendo uno y dos discos impregnados en sangre y secados de acuerdo con el apartado 4.2.1. Finalmente, se valoró la sensibilidad a la que debía realizarse la lectura de la fluorescencia en el espectrofotómetro.

Para la realización de las pruebas de optimización descritas, las muestras fueron ensayadas por triplicado (contando cada una de ellas con su correspondiente blanco), según el procedimiento que sigue: tras la elución del/los disco/s en 375 μ L de tampón de elución mediante agitación continua (F200, Falc) a temperatura ambiente durante una hora. Se añadieron 50 μ L del eluido a los pocillos de las réplicas de ensayo, de una placa de micrométodo de poliestireno de 96 pocillos

especial para ensayos de fluorimetría (Thermo Scientific). A continuación, se añadieron 150µL del tampón de reacción a los pocillos de las réplicas de ensayo y los pocillos de las réplicas control negativo, conteniendo cada uno de ellos 1,5µL de 4-MU-β-D-glucopiranosido en di-metil-sufóxido (DMSO) 0,825M y 148,5µL de tampón citrato 0,1M–fosfato 0,2M (pH=5,0). Las placas fueron selladas con láminas de aluminio para placas de micrométodo (VWR) e incubadas en un baño seco (Heraeus, Thermo Scientific) a 37°C durante tiempo variable indicado en el apartado 3.3.2. La reacción se detuvo adicionando 100µL de etilendiamina 0,3M (pH 11) a todos los pocillos. Finalmente se adicionaron 50µL del eluido, mantenido a temperatura ambiente, a los pocillos de las réplicas control negativo. Se realizaron dos lecturas ($\lambda_{\text{excitación}}=366$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=446$ nm) en un fluorímetro de placas (Sinergy HT, Biotek). La media de la lectura de la fluorescencia cruda de las réplicas de ensayo se normalizó por la diferencia de la lectura de la fluorescencia cruda de las réplicas control negativo del mismo individuo. El valor de esta diferencia se interpoló en una recta de calibración, utilizando la molécula reportera 4-MU como estándar. Dicha recta se construyó mediante la realización de diluciones seriadas, partiendo de una solución de trabajo 8µM de 4-MU, obteniéndose un rango de 0-400 pmoles. La actividad enzimática se expresó en µmoles de 4-MU liberada por litro de sangre por hora. Todos los reactivos utilizados en esta técnica fueron proporcionados por Sigma®.

4.3.2. Cinética enzimática

Se realizaron pruebas de cinética enzimática incubando la misma muestra control a diferentes tiempos (intervalo 3-30h), según el procedimiento descrito en 4.3.1, tras los cuales se midió la fluorescencia producida (Sinergy HT, Biotek).

4.3.3. Pruebas de estabilidad

Para determinar las condiciones óptimas de almacenamiento de las tarjetas de GSS se analizó la influencia de los diversos factores pre-analíticos^{28,29} que pudieran comprometer la estabilidad de la enzima en el soporte del papel de filtro (tiempo de almacenamiento desde la extracción y temperatura/humedad relativa del almacenamiento). Para ello, se tomaron muestras de GSS de un sujeto control sano que fueron almacenadas a -20°C (12339, Koxka Zaragoza), a +4°C (3KEB5611, Balay) y a temperatura ambiente, respectivamente; se determinó la actividad enzimática (metodología descrita en 4.3.1) ensayando triplicados de cada muestra para cada temperatura de almacenamiento cada 7 días durante 56 días, analizándose la tasa de reducción de actividad enzimática entre el día 0 y el día 56.

4.3.4. Control de calidad

Con el fin de asegurar la calidad y validez de los ensayos, cada muestra se analizó por triplicado, y se introdujeron tres sujetos control previamente testados en cada placa: un afecto, un portador y un sujeto sano. Se permitió un 20% de variabilidad

interensayo y un 10% intraensayo. La variabilidad interensayo de las pendientes de las rectas de calibración tampoco podía superar el 10%.

4.4. ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA ÁCIDA EN EXTRACTO LEUCOCITARIO

La actividad GC en leucocitos se determinó según el método descrito a continuación, adaptado del de *Raghavan et al.*²⁰ Los extractos leucocitarios se resuspendieron en 400 μ L de tampón taurocolato 1% (m/v), y las células se lisaron utilizando ultrasonidos (75156, Vibra Cell) durante 2,15 minutos a una intensidad del 40%. Tras centrifugar a 25.000g durante 10 minutos a temperatura de +4°C (4-16K, Sigma Sartorius), se recogió el sobrenadante, donde se encontraba la GC, y se congeló a -20°C (12339, Koxka Zaragoza). Transcurridas 24 horas, las muestras se descongelaron a temperatura controlada de +4°C (3KEB5611, Balay) y volvieron a centrifugar a 25.000g durante 5 minutos a temperatura de +4°C (4-16K, Sigma Sartorius). Recogido el sobrenadante, la concentración de proteína total se determinó cuantificando la absorbancia a 280nm mediante un espectrofotómetro (Nanodrop 2000c, Thermo Fisher) y se ajustó a 1mg/mL usando tampón taurocolato 1% (m/v). Se ensayó por triplicado, en un microtubo de ensayo de 1,5 mL, 50 μ L de este extracto de proteínas de concentración 1mg/mL al que se añadió 150 μ L del tampón de reacción, compuesto por 4-MU- β -D-glucopiranosido 16mM preparado en agua destilada, tampón citrato 0,1M-fosfato 0,2M (pH=5,0) y tampón taurocolato 2%(m/v) + Triton X-100 1% (v/v), todos ellos a partes iguales. Tras 2 horas de incubación a 37°C usando un baño seco (Multiplacas, Selecta), se paró la reacción con etilendiamina 0,1M (pH 11,0) y se midió la fluorescencia producida por la 4-MU ($\lambda_{excitación}=366$ nm y $\lambda_{emisión}=446$ nm) en un fluorímetro (LS45, Perkin Elmer). La media de la lectura de la fluorescencia cruda de las réplicas de ensayo se normalizó por la diferencia de la lectura de la fluorescencia cruda de las réplicas control negativo del mismo individuo. El valor de esta diferencia se interpoló en una recta de calibración, utilizando la molécula reportera 4-MU como estándar. Dicha recta se construyó mediante la realización de diluciones seriadas, partiendo de dos solución de trabajo, una 25 μ M y otra 20 μ M de 4-MU, obteniéndose un rango de 0-2,5 nmoles. La actividad enzimática se expresó en nanomoles de 4-MU liberada por mg de proteína por hora. Todos los reactivos utilizados en esta técnica fueron proporcionados por Sigma®.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando SPSS (IBM, versión 25.0)³⁰, el programa libre R (versión 3.4.0)³¹ y el paquete R commander (versión 2.4.4)³². Las variables cualitativas fueron descritas según su frecuencia y porcentajes y comparadas mediante inferencia con el test de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher. La normalidad de la distribución de las variables cuantitativas se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnov y éstas fueron descritas con la mediana y el rango intercuartílico (Percentil 25 - Percentil 75). La determinación de las diferencias entre

los grupos de estudio se hizo con los test no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. La correlación entre las actividades enzimáticas medidas en GSS y en leucocitos se estudió mediante el test de Spearman. La sensibilidad, especificidad y el valor de corte de la técnica de GSS se establecieron mediante una curva característica operativa del receptor (COR) calculando el índice de Youden.

Todos los test fueron realizados tomando un nivel de significación bilateral de $\alpha=0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Tras revisar la base de datos de la FEETEG, se seleccionó una población de estudio integrada por 85 individuos, entre los que se encontraban 45 controles sanos, 22 portadores y 18 afectados de EG (Tabla 2).

Tabla 2. Datos demográficos de la población de estudio

Grupo	Subtotal n (%)	Mujeres n (%)	Hombres n (%)	Edad* [Mediana (RIC)]	Sin datos n
Controles	45 (52,9)	22 (48,9)	23 (51,1)	40,2 (28,5-50,5)	30
Portadores	22 (25)	10 (45,5)	12 (54,5)	41,0 (30,5-48,5)	14
Afectos	18 (21,2)	4 (22,2)	14 (77,8)	34,0 (11,5-42,5)	4
Total	85	36 (42,2)	49 (57,8)	38,0 (16,0-46,0)	48

*RIC = Rango intercuartílico = (Percentil 25 -Percentil 75). La columna "Sin datos" corresponde al número de individuos de los que no se conocía la edad.

No existen diferencias significativas en cuanto a la distribución del género ($p=0,24$), ni respecto a la edad ($p=0,39$) entre los diferentes grupos de estudio.

5.2. MÉTODO OPTIMIZADO PARA EL ANÁLISIS DE β -GLUCOSIDASA ÁCIDA EN GOTA DE SANGRE SECA

Tras la realización de las pertinentes pruebas de optimización indicadas en el apartado 4.3.1 de este trabajo, los resultados obtenidos para cada una de las variables propuestas quedan descritos a continuación.

Los tampones taurocolato sódico 3,6% (m/v) + Tritón X-100 0,6% (v/v) y taurodeoxicolato sódico 3,6% (m/v) + Tritón X-100 0,6% (v/v) fueron ensayados con uno y dos discos, a 3, 5 y 22 horas, comprobando como variaban los valores de actividad según la cantidad de proteína eluida (Figura 7).

No existían diferencias significativas la utilización de un tampón de elución u otro ($p < 0,05$), por lo que se optó por utilizar un solo disco en la elución, para tratar de preservar la mayor cantidad de muestra intacta, y taurocolato sódico 3,6% (m/v) + Tritón X 100 0,6% (v/v) como eluyente, por analogía con el procedimiento en leucocitos.

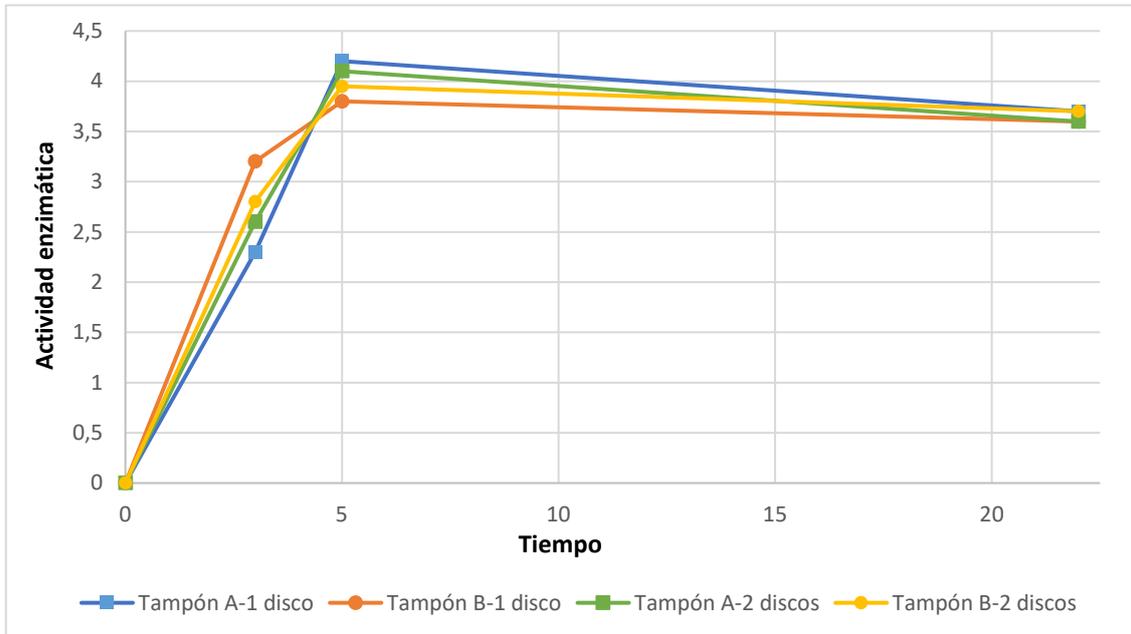


Figura 7. Variación de la actividad enzimática en las pruebas de optimización. Comparación de los valores de actividad obtenidos, expresados en μmol de 4-MU liberada/L sangre/h, utilizando como eluyentes los tampones A y B. Tampón A: tampón taurocolato sódico 3,6% (m/v) + Tritón X-100 0,6% (v/v). Tampón B: tampón taurodeoxicolato sódico 3,6% (m/v) + Tritón X-100 0,6% (v/v).

A continuación, con las condiciones indicadas en este mismo apartado, se ensayó la cinética de la enzima (Figura 8), según el protocolo descrito en la subsección 4.3.1 del apartado de material y métodos.

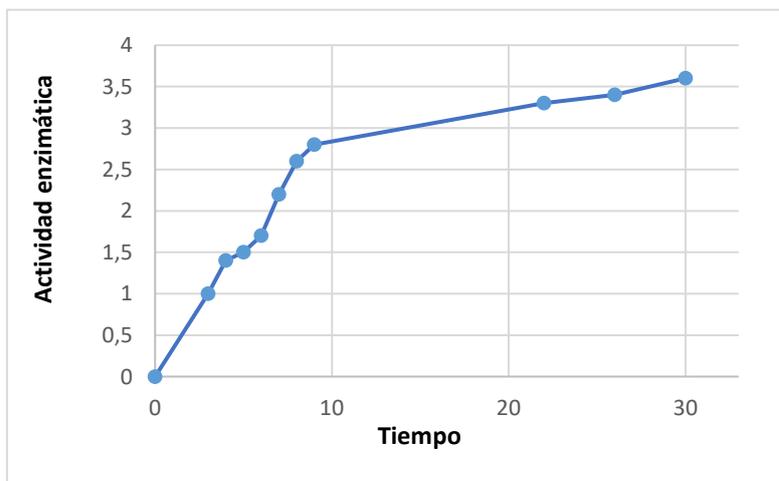


Figura 8. Curva de cinética enzimática. Actividad expresada en μmol de 4-MU liberada/L sangre/h, respecto al tiempo, en horas.

Se observó que entre las 10-22h de incubación, la tasa de incremento de actividad enzimática era claramente menor sin haber alcanzado la fase de meseta, por tanto, se decidió que el tiempo de incubación óptimo para este ensayo era de 22 horas.

Finalmente, y teniendo en cuenta los valores de fluorescencia obtenidos al ensayar una muestra control bajo las condiciones anteriores durante 22 h (Tabla 3), se escogió una sensibilidad de lectura en el fluorímetro del 70%, lo que permitía diferenciar controles y portadores de afectos, sin superar el límite de detección del equipo.

Tabla 3. Sensibilidad de la detección fluorimétrica

Sensibilidad (%)	Fluorescencia (URF)
50	1411
60	5513
70	16757
80	43640
90	Saturación

URF=unidades relativas de fluorescencia.

5.3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Teniendo en cuenta los resultados de las variables optimizadas en el apartado 5.2, así como el procedimiento recogido en el apartado 4.3.1 de materiales y métodos, el procedimiento final de cribado quedó optimizado como se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones optimizadas de las variables metodológicas del ensayo enzimático

Variable	Reactivo/Condición	Variable	Reactivo/Condición
Nº de discos de 3m	1	Tiempo de incubación	22h
Tampón de elución	50µL taurocolato sódico 3,6% (m/v) + Triton X-100 0,6% (v/v)	Temperatura de incubación	37°C
Tiempo de elución	1h	Tampón de parada	100µL etilendiamina 0,3M (pH 11)
Tampón de reacción	1,5µL 4-metilumbeliferil-β-D-glucopiranosido 0,825M + 148,5µL Tampón citrato 0,1M – fosfato 0,2M (pH 5)	Sensibilidad de lectura	70%

Valores indicados por micropocillo

Los valores de actividad enzimática obtenidos en las muestras GSS bajo dicho protocolo demuestran seguir un tipo de distribución no normal, $p < 0,001$, por lo que se le aplicarán test no paramétricos (Figuras 14 y 15, Anexo I).

La actividad enzimática de la GC en GSS se ilustra en la Figura 9; en cada uno de los grupos de estudio existen diferencias estadísticamente significativas entre los controles y el resto de los grupos (Tabla 5).

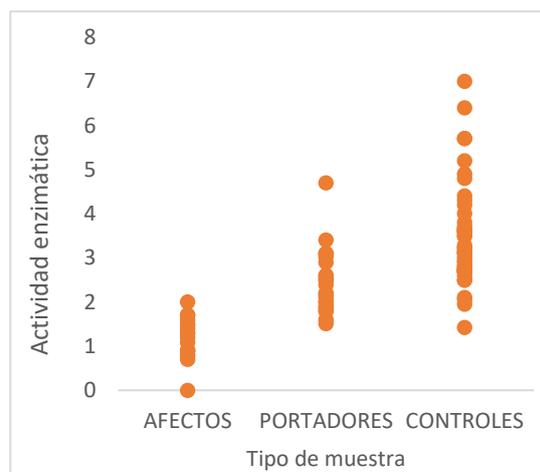


Figura 9. Diagrama de dispersión de la β-glucosidasa ácida en gota de sangre seca. Actividad expresada en µmol de 4-MU liberada/L sangre/h, de los 85 sujetos de estudio, separados por grupos.

Tabla 5. Actividad de la β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca

Grupo	Actividad Enzimática		p
	Mediana	RIC	
Controles	3,20	2,7-3,8	-
Portadores	2,29	1,9-2,8	$4,12 \cdot 10^{-5}$
Afectos	1,25	0,9-1,5	$1,44 \cdot 10^{-9}$

Actividad enzimática expresan en μmol de 4-MU liberada/L sangre/h. RIC=rango intercuartílico (percentil 25-percentil 75).

En el caso particular de los portadores, sus actividades eran menores que las del grupo control, pero más altas que las de los afectados, generando un rango de valores característico de los heterocigotos. Sin embargo, existe un solapamiento con los controles, por lo que ambos grupos no pueden ser distinguidos basándose exclusivamente en la actividad enzimática, como ya apuntaban investigaciones previas^{23,25}. A pesar de ello, y puesto que los valores en afectados son sustancialmente más bajos que en portadores y controles, puede afirmarse que, el método propuesto es útil para detectar potenciales pacientes de EG en estudios de cribado poblacional.

Es importante remarcar el hecho de que este nuevo protocolo cumple con el propósito de facilitar la identificación de posibles pacientes, reduciendo el número de individuos en los que se aplicarán métodos más laboriosos, como son el ensayo enzimático en extracto leucocitario o el análisis genético, pero no constituye por sí mismo un método diagnóstico de la enfermedad. Los individuos que se muestren como sospechosos en este test serán finalmente diagnosticados mediante el ensayo en extracto leucocitario en primera instancia

5.4. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y PUNTO DE CORTE DE LA β -GLUCOSIDASA Ácida EN GOTA DE SANGRE SECA

Mediante la realización de una curva característica del operador (Figura 10) y el cálculo del índice de Youden, se determinó un valor de actividad enzimática de 2,06 $\mu\text{mol/L}$ sangre/h como valor de corte para diferenciar afectados de EG del resto de individuos.

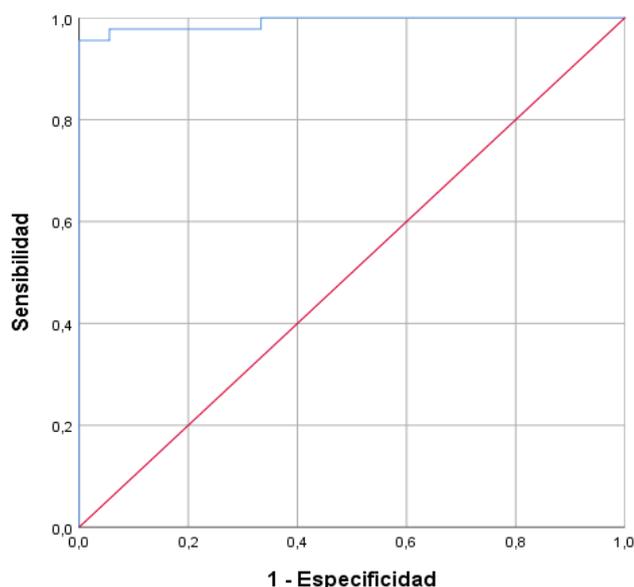


Figura 10. Curva característica operativa del receptor (COR) Muestra la relación entre la sensibilidad y 1-especificidad (falsos positivos). Área bajo la curva = 0,99.

La actividad en GSS como predictor de EG tiene un área bajo la curva de 0,99 (intervalo de confianza al 95% = 0,97-1). La sensibilidad obtenida fue del 95% y la especificidad del 100%, lo que confirmó la validez del procedimiento.

Existe gran variabilidad entre los valores de corte reportados previamente por otros autores como *Kang et al.* (30 $\mu\text{mol/L}$ sangre/h), *Uribe et al.* (5,6 $\mu\text{mol/L}$ sangre/h) o *Aldemir et al.* (0,92 $\mu\text{mol/L}$ sangre/h), estando el valor obtenido en el presente trabajo dentro del rango de los mencionados. La disparidad encontrada entre diferentes estudios evidencia la necesidad de cada laboratorio de establecer y validar sus propios procedimientos para diferenciar individuos sanos de afectos, teniendo en consideración el efecto que ejercen las condiciones ambientales y las características de la población de estudio. Se ha comprobado que los valores de actividad enzimática difieren entre niños y adultos (lo que podría deberse a la maduración del sistema hepático y linforreticular con la edad)^{26,33}, así como entre etnias, lo que se vislumbra al comparar los rangos de actividad de afectos de EG obtenidos en estudios en India (0,062-2 nmol/ml sangre/h)²⁴ y Colombia (0,39-5,3 nmol/ml sangre/h)²⁷.

5.5. CONTROL DE CALIDAD

Durante el análisis de las muestras en GSS, se comprobó que, en general, los resultados obtenidos cumplían con los criterios de calidad intraensayo establecidos. La variabilidad interensayo entre los individuos control, así como entre las pendientes de las rectas de calibrado quedan recogidos en la Tabla 6. Fue necesario repetir la placa 5 ya que no se cumplían las premisas de la variabilidad óptima interensayo, quedando ese lote de muestras invalidado.

Tabla 6. Variabilidad interensayo de la actividad β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca

Grupo	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Placa 6
Control	-	13	1	11	56	20
Portador	-	1	17	15	15	2
Afecto	-	13	13	1	60	11
Pendiente recta	-	10	2	4	3	2

Los valores representan el coeficiente de variación (CV) entre los valores de actividad obtenidos en una placa y la anterior. Los valores límite establecidos previamente permitían un CV intraensayo menor al 20% para las muestras y menor al 10% para la pendiente de la recta.

Los controles de calidad introducidos en los ensayos mostraron que la técnica era reproducible, con una media en el coeficiente de variación interensayo de 16,6% (20,2% para los controles, 10% para los portadores y 19,6% para los afectos) lo que no se aleja de lo recogido en artículos como el de *Uribe et al.*, cuya variabilidad media era del 14,7%.

5.6. ESTABILIDAD

Trabajar con GSS, ya sea para cribado de la EG como en este caso o para otras determinaciones, presenta numerosas ventajas, como la facilidad en la toma de muestras, el transporte (no necesita refrigeración) y el almacenamiento, o la sencillez y sensibilidad de los métodos que las utilizan. Sin embargo, deben tomarse algunas precauciones con el fin de evitar el deterioro de la enzima.

La principal de ellas sería el control de la temperatura de almacenamiento. Los ensayos de estabilidad llevados a cabo, y cuyos resultados quedan representados en la Figura 11, demuestran la dependencia entre la actividad enzimática y la temperatura de almacenamiento. Transcurridas 8 semanas, los porcentajes de actividad de las muestras a temperatura ambiente, a +4°C y a -20°C se redujeron un 50%, 28% y 34%, respectivamente.

De acuerdo lo observado, así como a experiencias anteriores²⁷, puede concluirse que, durante las 8 primeras semanas de conservación de la muestra, el deterioro de la actividad enzimática se ralentiza si la muestra es almacenada a temperaturas más bajas, no existiendo diferencias sustanciales entre su conservación a +4°C y -20°C.

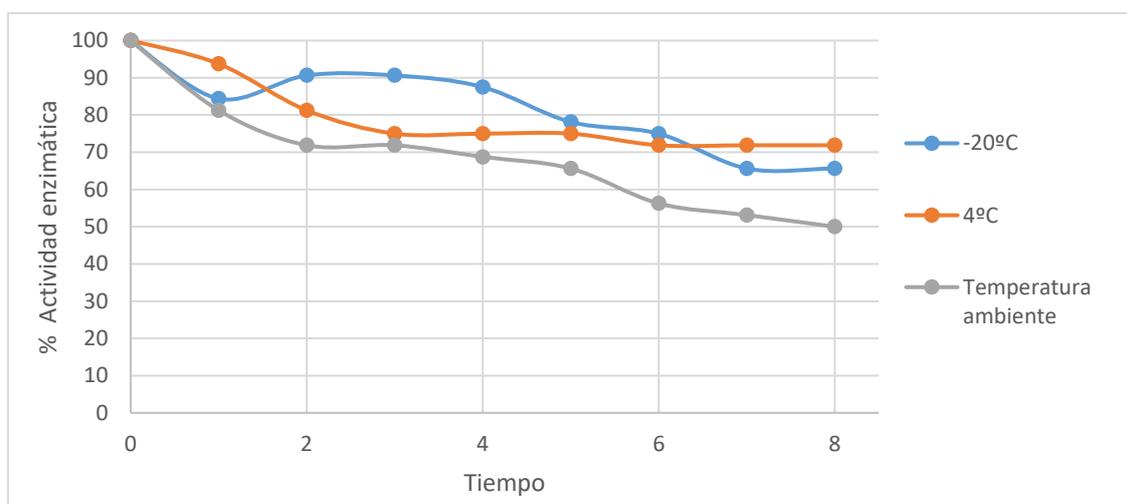


Figura 11. Estabilidad pre-analítica de la actividad β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca. Actividad representada como % de variación de la actividad enzimática respecto del momento inicial a lo largo del tiempo (en semanas) desde la toma de la muestra.

También deben valorarse factores como la frecuente leucopenia sufrida por los afectos de EG, que podría afectar a la calidad de la muestra y, en consecuencia, a determinación analítica, según han apuntado algunos autores²⁷.

Otras limitaciones a tener en cuenta serían la antigüedad de algunas muestras, ya que se trata de un estudio ambispectivo, en las que el tiempo ha podido disminuir considerablemente la actividad enzimática en el caso de las muestras incluidas en el estudio de manera retrospectiva; o la posibilidad de que, en pacientes tratados,

los valores se vean ligeramente aumentados debido a la persistencia de enzima recombinante o al TRS³⁴, a pesar de que las muestras están tomadas transcurrido el tiempo necesario como para que esto no ocurra.

5.7. ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA ÁCIDA EN LEUCOCITOS

Para comprobar la validez de este procedimiento de cribado en GSS según su exactitud para discriminar a los pacientes afectados de los no afectados, se buscó compararlo con el procedimiento de referencia que confirmase los resultados: la determinación de la actividad GC en extracto de leucocitos.

Los valores obtenidos tras realizar el procedimiento de determinación de la actividad enzimática en el extracto leucocitario descrito con anterioridad en el apartado 4.4 se muestran en la Figura 12. Al igual que en el caso anterior, la diferencia de actividad enzimática del grupo de afectados respecto al resto fue significativa (Tabla 7).

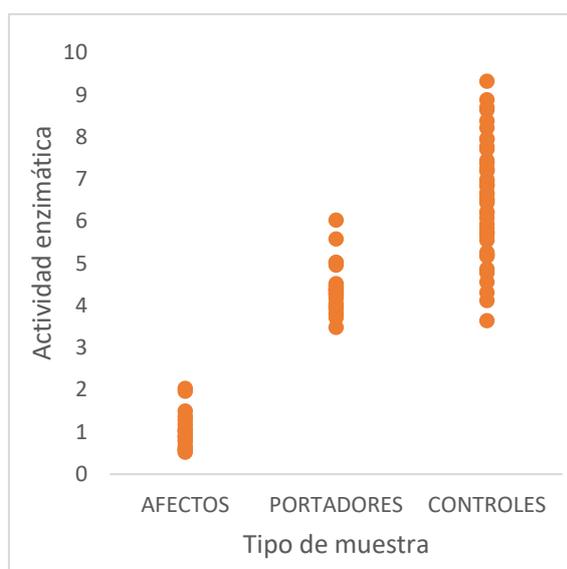


Figura 12. Diagrama de dispersión de la β -glucosidasa ácida en extracto leucocitario. Actividad expresada en nmol de 4-MU liberada/mg de proteína/h.

Tabla 7. Actividad de la β -glucosidasa ácida en extracto leucocitario

Grupo	Actividad Enzimática		p
	Mediana	RIC	
Controles	6,5	1,71-7,38	-
Portadores	4,33	4-4,51	$2,48 \cdot 10^{-8}$
Afectos	0,96	0,52-1,26	$7,53 \cdot 10^{-10}$

Los valores de actividad enzimática se expresan en nmol de 4-MU liberada/mg de proteína/h.

5.8. ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA ÁCIDA EN LEUCOCITOS VS GOTA DE SANGRE SECA

Para llevar a cabo la validación del procedimiento propuesto, se procedió a comparar los valores de actividad en GSS con los obtenidos en el homogeneizado de leucocitos de todas las muestras (Figura 13).

Debido a la naturaleza de las muestras, no puede demostrarse una correlación cuantitativa exacta entre ambas, ya que la actividad en GSS está calculada sobre un volumen aproximado de sangre en el disco de papel de filtro, y en el

homogeneizado de leucocitos se expresa según la cantidad de proteína cuantificada previamente, lo que hace a esta última medida más precisa. Sin embargo, a la vista de los resultados se puede afirmar que la correlación cualitativa entre ambas es buena ($p < 0,001$, $r = 0,72$).

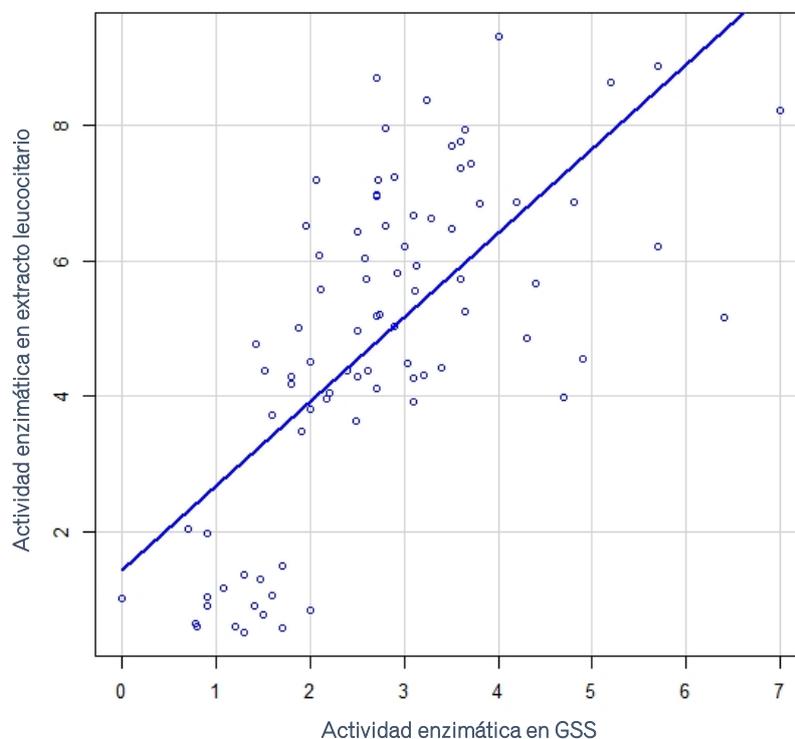


Figura 13. Actividad β -glucosidasa ácida en gota de sangre seca vs extracto leucocitario. Actividad en extracto leucocitario expresada en nmol de 4-MU liberada/mg de proteína/h, y en gota de sangre seca en μ mol de 4-MU liberada/L sangre/h.

6. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio nos permite concluir que:

- 1- El análisis de actividad enzimática en GSS es un método de cribado rápido y fiable, útil para detectar potenciales afectos de EG. La sensibilidad del 95% y especificidad del 100% permiten descartar con certeza aquellos pacientes con valores iguales o superiores a $2,06 \mu\text{mol/L}$ sangre/h como afectos para la EG.
- 2- Todo resultado, derivado del cribado mediante GSS, considerado como anómalo ($< 2,06 \mu\text{mol/L}$ sangre/h) requiere *a posteriori* realizar la confirmación en extracto leucocitario, a pesar de existir una buena correlación entre ambos procedimientos.

CONCLUSIONS

The analysis of obtained results in the present study allows us concluding that:

- 1- The enzymatic analysis in DBS is a quick and reliable screening method, useful to distinguish potential patients of Gaucher disease. Sensitivity of 95% and specificity of 100% allows discard confidently patients with values above 2,06 $\mu\text{mol/L}$ blood/h as affected.
- 2- In spite of the good correlation between both procedures, all result, coming from this DBS screening, considered anomalous ($<2,06 \mu\text{mol/L}$ blood/h), needs to be confirmed by performing the measurement of enzymatic activity in leukocyte extract.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Mistry, P. K., Belmatoug, N., vom Dahl, S. & Giugliani, R. Understanding the natural history of Gaucher disease. *Am. J. Hematol.* **90**, S6–S11 (2015).
2. Brill, N., Mandlebaum, F. . S. & Libman, E. Primary splenomegaly-Gaucher type. *Am. J. Med. Sci.* **129**, (1905).
3. Aghion, H. *La Maladie de Gaucher dans l'enfance: forme cardio-rénale [doctoral tesis]*. (Faculté de Médecine de Paris, 1934).
4. Brady, R. O., Kanfer, J. N. & Shapiro, D. Metabolism of glucocerebrosides II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 221–225 (1965).
5. Horowitz, M. *et al.* The Human Glucocerebrosidase Gene and Pseudogene : Structure and Evolution. *Genomics* **4**, 87–96 (1989).
6. Giraldo Castellano, P. Introducción a la enfermedad de Gaucher: concepto, epidemiología, genética e historia natural. in *Enfermedades lisosomales* (eds. Álvarez de Mon Soto, M., Plaza Romero, S. & Navas Serrano, V. M.) 275–285 (2017).
7. Futerman, A. H. & Riezman, H. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* **15**, 312–318 (2005).
8. Stirnemann, J. *et al.* A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 441 (2017).
9. Cenarro, A., Giraldo, P., Pérez Calvo, J. & Pocoví, M. El gen de la β -glucocerebrosidasa: un gen implicado en la enfermedad de Gaucher y en la hipoalfalipoproteinemia. *Clínica e Investig. en Arterioscler.* **13**, 28–35 (2001).
10. Villarrubia Espinosa, J. Cuadro clínico: implicaciones hematológicas en la enfermedad de Gaucher. in *Enfermedades lisosomales* (eds. Álvarez de Mon Soto, M., Plaza Romero, S. & Navas Serrano, V. M.) 287–299 (2017).

11. Mistry, P. K., Sadan, S., Yang, R., Yee, J. & Yang, M. Consequences of diagnostic delays in type 1 Gaucher disease: The need for greater awareness among Hematologists–Oncologists and an opportunity for early diagnosis and intervention. *Am. J. Hematol.* **82**, 807–811 (2007).
12. Guggenbuhl, P., Grosbois, B. & Chalès, G. Gaucher disease. *Jt. Bone Spine* **75**, 116–124 (2008).
13. Torralba Cabeza, M. Á. Cuadro clínico: manifestaciones óseas de la enfermedad de Gaucher. in *Enfermedades lisosomales* (eds. Álvarez de Mon Soto, M., Plaza Romero, S. & Navas Serrano, V. M.) 301–312 (2017).
14. Tyłki-Szymańska, A. *et al.* Non-neuronopathic Gaucher disease due to saposin C deficiency. *Clin. Genet.* **72**, 538–542 (2007).
15. Nalysnyk, L., Rotella, P., Simeone, J. C., Hamed, A. & Weinreb, N. Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature. *Hematology* **22**, 65–73 (2017).
16. Aerts, J. M. F. G. *et al.* Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr.* **94**, 43–46 (2005).
17. Hollak, C. E. M., Van Weely, S., Van Oers, M. H. J. & Aerts, J. M. F. G. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J. Clin. Invest.* **93**, 1288–1292 (1994).
18. Gort, L. & José Coll, M. Diagnóstico, biomarcadores y alteraciones bioquímicas de la enfermedad de Gaucher. *Med. Clin. (Barc).* **137**, 12–16 (2011).
19. Rolfs, A. *et al.* Glucosylsphingosine is a highly sensitive and specific biomarker for primary diagnostic and follow-up monitoring in gaucher disease in a non-jewish, caucasian cohort of gaucher disease patients. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
20. Raghavan, S. S., Topol, J. & Kolodny, E. H. Leukocyte B-Glucosidase in Homozygotes and Heterozygotes for Gaucher Disease. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 158–173 (1980).
21. Pocoví Mieras, M. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Gaucher. in *Enfermedades lisosomales* (eds. Álvarez de Mon Soto, M., Plaza Romero, S. & Navas Serrano, V. M.) 353–362 (2017).
22. Giraldo Castellano, P. Tratamiento por reducción de sustrato, tratamientos sintomáticos y futuros tratamientos en la enfermedad de Gaucher. in *Enfermedades lisosomales* (eds. Álvarez de Mon Soto, M., Plaza Romero, S. & Navas Serrano, V. M.) 383–393 (2017).
23. Kang, L., Zhan, X., Gu, X. & Zhang, H. Successful newborn screening for Gaucher disease using fluorometric assay in China. *J. Hum. Genet.* **62**, 763–768 (2017).
24. Verma, J. *et al.* Inherited Metabolic Disorders: Efficacy of Enzyme Assays on Dried Blood Spots for the Diagnosis of Lysosomal Storage Disorders. *JIMD*

- Rep.* **4**, 113–116 (2012).
25. Chamoles, N. A., Blanco, M., Gaggioli, D. & Casentini. Gaucher and Niemann-Pick diseases-enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn screening cards. *Clin. Chim. Acta.* **317**, 191–197 (2002).
 26. Aldemir, O. *et al.* Reference intervals of α -glycosidase, β -glycosidase, and α -galactosidase in dried blood spot in a Turkish newborn population. *Eur. J. Pediatr.* **172**, 1221–1227 (2013).
 27. Uribe, A. & Giugliani, R. Selective Screening for Lysosomal Storage Diseases with Dried Blood Spots Collected on Filter Paper in 4,700 High-Risk Colombian Subjects. *JIMD Rep.* **4**, 113–116 (2013).
 28. Chamoles, N. A., Blanco, M. B., Gaggioli, D. & Casentini, C. Hurler-like phenotype: Enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin. Chem.* **47**, 2098–2102 (2001).
 29. Olivova, P. *et al.* Effect of sample collection on α -galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper. *Clin. Chim. Acta* **403**, 159–162 (2009).
 30. IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.
 31. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2017).
 32. Fox, J. & Bouchet-Valat, M. Rcmdr: R Commander. (2018).
 33. Civallero, G. *et al.* Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin. Chim. Acta* **372**, 98–102 (2006).
 34. Alfonso, P. *et al.* Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid β -glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations. *Blood Cells, Mol. Dis.* **35**, 268–276 (2005).

